



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta textilní



Karboxymethylcelulóza v textilních aplikacích

Disertační práce

Studijní program: P3106 – Textilní inženýrství

Studijní obor: 3106V015 – Textilní technika a materiálové inženýrství

Autor práce: **Ing. Karolína Voleská**

Vedoucí práce: prof. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.





Carboxymethylcellulose in Textile Applications

Dissertation

Study programme: P3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106V015 – Textile Technics and Materials Engineering
Author: **Ing. Karolína Voleská**
Supervisor: prof. Ing. Jakub Wiener, Ph.D.



Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Disertační práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že texty tištěné verze práce a elektronické verze práce vložené do IS STAG se shodují.

19. 3. 2019

Ing. Karolína Voleská

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Jakubu Wienerovi, Ph.D., vedoucímu mé disertační práce, za pomoc a cenné rady při jejím zpracování. Dále bych ráda poděkovala projektu NanoEnviCz (Velká výzkumná infrastruktura, LM2015073) za možnost využití přístrojového vybavení.

Anotace

Disertační práce se zabývá zmapováním vlastností karboxymethylcelulózy s cílem navrhnout úpravu karboxymethylcelulózy pro její následnou aplikaci v medicínském odvětví přesněji při hojení ran.

Část disertační práce se věnuje výběru vhodných metod síťování karboxymethylcelulózy za účelem vyvinutí hydrogelu s optimálními vlastnostmi. V práci je prezentována celá řada různých chemických síťovacích činidel, různé fyzikální metody síťování, ale například i využití radiace. Kromě vývoje hydrogelu, který by zajišťoval optimální podmínky hojení v ráně, se práce zabývá i aditivací karboxymethylcelulózy at' už antimikrobiálním stříbrem či vitamínem C a alaptidem, který stimuluje růst granulační tkáně a urychluje epitalizační proces a průběh hojení ran.

Nedílnou součástí hojení ran je i proliferace buněk. Za účelem zvýšit proliferaci buněk byl v rámci práce navrhnut a otestován postup výroby vysoce porézní struktury, která by novotvoření a dělení buněk podporovala. Vzorky krytí at' už v textilní formě či v podobě filmů byly testovány s ohledem na jejich antibakteriální vlastnosti, testována byla rovněž adheze a proliferace buněk či toxicita testovaných materiálů.

V poslední části práce je prezentována kratší studie o využití karboxymethylcelulózy i mimo medicínské aplikace. Využity byly komplexační schopnosti karboxymethylcelulózy vůči některým kovovým iontům, což ji předurčuje k použití při odstraňování iontů těžkých kovů z odpadních vod.

Klíčová slova

Karboxymethylcelulóza, hydrogel, hojení ran, absorpce, antibakteriální vlastnosti

Annotation

The dissertation deals with mapping of carboxymethylcellulose properties with the aim to propose carboxymethylcellulose treatment for its subsequent application in the medical sector more precisely in wound healing.

Part of the dissertation deals with the selection of suitable methods of crosslinking of carboxymethylcellulose to develop a hydrogel with optimal properties. A number of different chemical cross-linking agents, various physical methods of cross-linking, but also the use of radiation are presented in the thesis. In addition to the development of the hydrogel, which ensures optimal healing conditions in the wound, the work also deals with the addition of whether antimicrobial silver or vitamin C and alaptide, which stimulates the growth of granulation tissue and accelerates the epitalization process and wound healing.

Cell proliferation is an integral part of wound healing. In order to increase cell proliferation, the process of manufacturing a highly porous structure was designed and tested to support the formation and division of cells. Covering samples, whether in textile form or in the form of film, were tested for their antibacterial properties, cell adhesion and proliferation, and the toxicity of test materials were also tested.

The last part of the thesis presents a shorter study about the use of carboxymethylcellulose outside of medical applications. The complexation capabilities of carboxymethylcellulose against some metal ions have been used, which makes it suitable for use in removing heavy metal ions from wastewater.

Keywords

Carboxymethylcellulose, hydrogel, wound healing, absorption, antibacterial properties

Seznam zkratek

aj.	a jiný, a jiní, a jinak
AA	kyselina akrylová
AFM	mikroskopie atomárních sil
AIBN	Azobisisobutyronitrile
BC	bakteriální celulóza
BDDGE	1,4-butanediol diglycidyl ether
CMC	karboxymethylcelulóza
CPE	chemické permeační enhancery
CT	výpočetní tomografie
DS	stupeň substituce
DVS	divinylsulfon
E	epichlorhydrin
EDMA	Ethylen dimethacrylate
FTIR	infračervená spektroskopie
HEC	hydroxyethyl celulóza
HPC	hydroxypropyl celulóza
HPMC	hydroxypropylmethyl celulóza
HSAB	teorie tvrdých a měkkých, kyselin a zásad
ICP	spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
KP	kationaktivní prostředek
MC	methyl celulóza
MDI	4,4 difenylmetan diisokyanát
MEKO	methylethyl ketoxim
MIF	inhibiční faktor migrace makrofágů
MW	molekulová hmotnost
NaCMC	sodná sůl karboxymethylcelulózy
PBS	phosphate Buffered Saline
PMS	n-methyl dibenzo pyrazine methyl sulfate
PPG	polypropylen glykol
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SAP	superabsorpční polymery
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
tzv.	takzvaný, takzvaně
UV	ultrafialové záření

Obsah

Anotace

Annotation

Seznam zkratek

1	Předmět a cíl práce	19
2	Přehled současného stavu problematiky	20
2.1	Polysacharidy	20
2.2	Celulóza a celulózová vlákna	21
2.2.1	Celulóza	22
2.2.2	Využití celulózy	24
2.2.3	Deriváty celulózy	24
2.3	Karboxymethylcelulóza	29
2.3.1	Výroba	29
2.3.2	Struktura	30
2.3.3	Vlastnosti CMC	30
2.3.3.1	Viskozita CMC	31
2.3.3.2	Stupeň substituce	31
2.3.3.3	Biodegradabilita a kompatibilita	33
2.3.4	Využití CMC	33
2.4	Síťování CMC	34
2.4.1	Chemické síťování CMC	34
2.4.1.1	Síťování CMC pomocí epichlorhydrinu	35
2.4.1.2	Síťování CMC pomocí karbodiimidů	36
2.4.1.3	Síťování CMC pomocí vodíkových vazeb	36
2.4.2	Radiačním zářením	37
2.4.3	Fyzikální síťování	38
2.4.3.1	Termické síťování	38
2.4.3.1.1	Ohřívání/chlazení polymerního roztoku	39
2.5	Hydrogely	39
2.5.1	Hydrogely na bázi celulózy	40
2.5.1.1	Bobtnání	41
2.5.1.2	Aplikace	41
2.6	Modifikace CMC pomocí nanočástic	44

2.6.1	Příprava nanočástic stříbra	44
2.6.2	Antibakteriální aktivita nanočástic stříbra	45
2.7	3D struktury vhodné pro proliferaci buněk	45
2.8	Modifikace pomocí Alaptidu	46
2.8.1	Alaptid	46
2.9	Sorpce iontů kovů	48
3	Experimentální část	50
3.1	Použité výchozí materiály	50
3.1.1	Další pomocné chemikálie	50
3.2	Metody přípravy roztoků	51
3.2.1	Metody přípravy filmů	52
3.3	Sítování	52
3.3.1	Fyzikálními metodami	52
3.3.1.1	Mrazicí cykly	52
3.3.1.2	Vysokou teplotou	52
3.3.2	Chemickými činidly	53
3.3.2.1	1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) [67]	53
3.3.2.2	Karboxylové kyseliny	53
3.3.2.3	Kationaktivní prostředek	53
3.3.2.4	Etylen-dimetakrylát/2,2'-azobisisobutyronitril (EDMA/AIBN) [68]	53
3.3.2.5	Epichlorhydrin	54
3.3.3	Radiační	54
3.3.3.1.1	Sítování gama zářením	54
3.3.3.1.2	Sítování plazmatem	54
3.4	Příprava 3D mikroporézní struktury	54
3.5	Modifikace pomocí nanočástic stříbra	54
3.6	Příprava vzorků pro sorpci iontů kovů	55
3.6.1	Vlastnosti použitých sloučenin	55
3.7	Metody hodnocení	56
3.7.1	Měření obsahu či uvolňování stříbra	56
3.7.1.1	ICP (OES, MS)	56
3.7.1.2	Energiově disperzní spektroskopie EDS	57
3.7.2	Měření struktury	57

3.7.2.1	Skenovací elektronová mikroskopie SEM	57
3.7.2.2	E-SEM	58
3.7.2.3	Mikroskopie atomárních sil AFM	59
3.7.2.4	Transmisní elektronová mikroskopie TEM	59
3.7.3	Testování stupně zesílení	60
3.7.3.1	Měření absorpce a rozpustnosti	60
3.7.3.2	Testování stupně zesílení dle normy ČSN EN ISO 10147	60
3.7.4	Testování antibakteriálních vlastností	61
3.7.4.1	AATCC Test Method: 100–2004	61
3.7.4.2	AATCC Method 147 –2004	61
3.7.4.3	Test viability na základě neporušenosti plazmatické membrány	61
3.7.4.4	Test biocidity/biodegradability	63
3.7.4.4.1	Fluorescenční mikroskopie	63
3.7.5	Testování toxicity	64
3.7.5.1	Příprava buněk	64
3.7.5.1.1	Fibroblasty	64
3.7.5.1.2	Růstové médium	65
3.7.5.1.3	Kultivace a pasážování buněk	65
3.7.5.1.4	Počítání buněk pro účely určení koncentrace buněk	65
3.7.5.2	Stanovení viability buněk - XTT	66
3.7.5.2.1	Příprava extraktů	67
3.7.5.2.2	Test	67
3.7.5.2.2.1	Reakční kit	67
3.7.5.3	Live/dead (Testy viability využívající aktivity esteráz)	68
3.7.5.4	Testování adheze a proliferace buněk	68
3.7.5.4.1	MTT	68
3.7.6	Termoizolační vlastnosti	68
3.7.6.1	Měření tepelné vodivosti (λ), tepelné jímavosti (b) a tepelného odporu (r)	68
3.7.6.2	Inovativní zařízení pro měření termoizolačních vlastností	69
3.7.7	Další analýzy	69
3.7.7.1	FTIR	69
3.7.7.2	Testování prodyšnosti	69
3.7.7.3	Výpočetní tomografie (CT)	69

3.7.7.4	Změna jasu	70
3.7.7.5	Stanovení molekulové hmotnosti vlákněných forem CMC	70
4	Výsledky a vyhodnocení	71
4.1	Sítování CMC za účelem vytvoření hydrogelu s optimálními vlastnostmi	71
4.2	Testování absorpce v tlumivých roztocích	77
4.3	Příprava 3D mikroporézní struktury vhodné pro proliferaci buněk	82
4.3.1	Vhodnost lyofilizátů pro proliferaci buněk	86
4.4	In vitro testování modifikovaných vzorků s alaptidem	88
4.4.1	Stanovení obsahu Alaptidu	89
4.4.1.1	HPLC stanovení alaptidu	89
4.4.2	Test cytotoxicity	90
4.5	Modifikace CMC substrátů nanočásticemi stříbra – antibakteriální krytí	95
4.5.1	Redukce nanočástic stříbra teplem	95
4.5.2	Redukce nanočástic stříbra pomocí UV	98
4.5.2.1	Test antibakteriální aktivity	101
4.5.2.2	Test cytotoxicity	102
4.5.3	Redukce nanočástic stříbra pomocí vitamínu C	104
4.5.3.1	Antibakteriální aktivita	105
4.5.3.2	Antioxidační vlastnosti	106
4.5.3.3	Analýza struktury povrchu	106
4.6	Porovnání vzorku CMC s obsahem stříbra, CMC lyofilizátu, CMC filmu upraveného plazmatem a CMC filmu zesítovaného pomocí BDDGE	109
4.6.1	Struktura povrchu testovaných materiálů	111
4.6.1.1	Optický mikroskop	111
4.6.1.2	E-SEM	112
4.6.2	Tvorba bakteriálního biofilmu	113
4.6.2.1	Koncentrace bakterií E. Coli v bakteriálním roztoku	114
4.6.2.2	Kontrolní vzorek	114
4.6.2.3	Tvorba bakteriálního biofilmu	114
4.6.2.4	Testování	115
4.6.2.5	Výsledky	115
4.6.3	Test biocidity/biodegradability	119
4.6.4	Testování cytotoxicity	122
	Live/Dead	122

XTT	126
4.7 Sorpce iontů kovů	128
4.7.1 Základní experiment	128
4.7.2 Reakce povrstvené polyesterové tkaniny a iontů kovů	129
5 Diskuze a závěr	132
6 Publikace autora	134
7 Literární zdroje	137
Seznam obrázků	141
Seznam tabulek	144
Seznam grafů	145
Curriculum vitae	

1 Předmět a cíl práce

Současné dominující metody hojení ran a kožních defektů jsou založeny na tradičních krycích materiálech nebo na vlhkém hojení. Vlhká krytí (např. hydrokoloidy, hydrogely, polyuretany, vlhčená krytí) vytvářejí pro hojení optimální prostředí (vlhkost, teplo, odstranění mrtvé tkáně, absorpce exsudátu a bakterií, bariérový efekt). Riziko vlhkého hojení je vznik infekce, a proto se tato krytí kombinují zejména s baktericidním stříbrem.

Experimenty v rámci disertační práce jsou navrhovány tak, aby výsledné produkty byly vhodné pro použití ve zdravotnických aplikacích. Navržené metody jsou zaměřeny zejména na materiálový výzkum, tj. přípravu nových biokompatibilních materiálů. Materiálovou složkou vzorků je celulózová matrice, a to ve formě filmů, vláknitých a prostorových struktur nebo gelových struktur. Celulózové materiály nabízejí širokou možnost přípravy různých matric, které mohou nalézt široké uplatnění v hojení ran a regenerativní medicíně. Matricové systémy založené na látkách přírodního původu (karboxymethylcelulóza) umožňují vytvořit přípravky minimalizující bolest při manipulaci (nepřilnavé přípravky). Kromě vyvinutí materiálů vhodných pro krytí ran bylo snahou vyvinout materiál, který by byl vhodný pro růst a proliferaci buněk. Takovéto matrice by měly mít strukturu vzájemně propojených pórů a vysokou porozitu, aby zajistila pronikání buněk a dostačující přísun živin buňkám v průběhu formování, difúzi odpadních produktů ven z matrice i vyloučení produktů degradace matrice. Zpracováním antimikrobiálních látek do matricových systémů lze získat prostředky nejen účinné proti mikroorganismům, ale též vytvořit prostředí podporující hojení v ráně.

Za cíl si tato disertační práce klade:

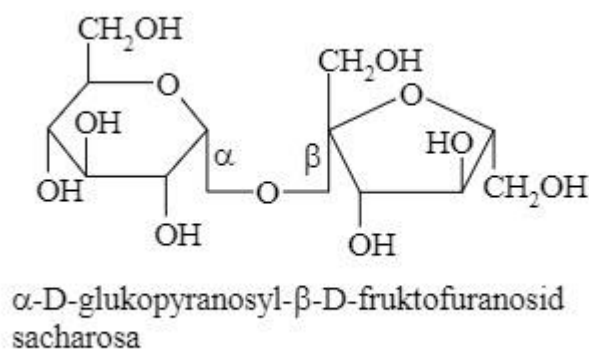
- 1) nalézt optimální podmínky síťování karboxymethylcelulózové matrice za účelem vytvoření hydrogelu s co nejvyšším poměrem absorpce/rozpustnosti
- 2) optimalizovat metodu přípravy 3D porézních struktur vhodných pro proliferaci buněk
- 3) modifikovat polymerní materiál pomocí alaptidu a vitamínu C za účelem podpory ráně se lépe hojit
- 4) modifikovat polymerní materiál pomocí nanočástic stříbra za účelem zvýšení antimikrobiální aktivity
- 5) uplatnění CMC na textilním nosiči v jiných než medicínských aplikacích

2 Přehled současného stavu problematiky

V této kapitole je nejdříve probrána celulóza jako výchozí materiál pro tvorbu karboxymethylcelulózy, dále pak karboxymethylcelulóza a některé její aplikace. V další části je pozornost kladena přípravě hydrogelů a možnostem jejich síťování. Další části jsou věnovány nanočásticím stříbra, možnostem jejich redukce, přípravy a inkorporace, rovněž je charakterizován alaptid pro jeho potenciál při regeneraci poraněné kůže. Poslední část je věnována možnosti využití karboxymethylcelulózy jako komplexačního činidla pro selektivní odstranění iontů kovů.

2.1 Polysacharidy

Jsou přírodní polymery, které vznikají spojením velkého počtu monosacharidových jednotek glykosidickou vazbou. Glykosidická vazba vzniká reakcí dvou hydroxylů – reaguje poloacetalová skupina, uvolňuje se molekula vody, zbytek molekul se spojují glykosidickou vazbou. Polysacharidy nemají redukční účinky (neredukují ani Fehlingovo ani Tollensovo činidlo-použití pro důkaz aldehydických či ketonických skupin), protože glykosidové vazby vznikají mezi poloacetalovými hydroxylly (př. viz Obr. 1).



Obr. 1: Ukázka glykosidické vazby [1]

Podle toho, na kterých atomech uhlíku vzniknou glykosidové vazby, rozdělujeme polysacharidy na lineární a větvené. U lineárních polysacharidů (celulóza) jsou sacharidové jednotky spojeny glykosidovými vazbami na 1 a 4 uhlíku. Větvené polysacharidy (škrob, glykogen) mají v hlavním řetězci glykosidové vazby na 1 a 4 uhlíku, postranní řetězce se připojují glykosidovou vazbou na 1 a 6 uhlíku. Polysacharidy nejsou sladké a nepatří mezi cukry. Většina polysacharidů má zásobní

nebo stavební funkci. Stavební polysacharidy jsou málo reaktivní a ve vodě téměř nerozpustné. Zásobní polysacharidy obsahují mnohem méně vodíkových můstků, proto při styku s vodou bobtnají a z části přecházejí do roztoku. Obecný vzorec je $C_n(H_2O)_{n-1}$.

Homosacharidy – polysacharidy, jejichž hydrolyzou vzniká výlučně D-glukosa, se nazývají D-glukany (škrob, celulóza, glykogen).

2.2 Celulóza a celulózová vlákna

Celulózová vlákna lze rozdělit na vlákna přírodní a chemická. Chemická vlákna na bázi celulózy lze rozdělit takto:

- a) vlákna z regenerované celulózy (viskózní vlákna, měďnatá vlákna)
- b) vlákna z esterů (derivátů) celulózy (acetátová vlákna, semidiacetátová vlákna, diacetátová vlákna)

Celulózovým vláknům jsou blízké příbuzná tzv. alginátová vlákna, která se získávají z mořských řas. Přírodní celulózová vlákna zahrnují mnoho druhů vláken a lze je rozdělit dle původu:

- a) Vlákna ze semen (vyrůstající z pokožky semen), do této skupiny patří především bavlna, kapok, akon a kokosová vlákna.
- b) Vlákna z lodyh a listů, do této skupiny patří lýková vlákna a vlákna z listů.

Mezi lýková vlákna len, konopí, juta a ramie. Dále do této skupiny patří vlákna z rostlin slézovitých, např. kenaf, rosselské konopí, konopí Gambo; vlákna z rostlin Aloe a Agave, např. sisal, kantala, vlákno Aloe perfoliata aj.

Základem všech těchto vláken je celulóza. Některá vlákna jako je např. bavlna a vlákna z regenerované celulózy tvoří téměř čistá celulóza. Většina přírodních rostlinných vláken je však doprovázena řadou dalších látek, z nichž některé patří do skupiny polysacharidů, jiné mají konstrukci zcela odlišnou (např. lignin). [2]

Mimo to se však celulóza vyskytuje i u některých živočichů, konkrétně u pláštěnců (Tunicata). Syntézu celulózy provádí enzym celulóza syntáza, který je součástí membrány rostlinné buňky. Je to rozměrný enzym, který zároveň syntetizuje vždy 36 makromolekul. Ty se okamžitě spojují do kompaktní mikrofibrily a vytváří vazby s buněčnou stěnou. Pohyb komplexu plazmatickou membránou určuje směr uložení mikrofibrily ve stěně. [2]

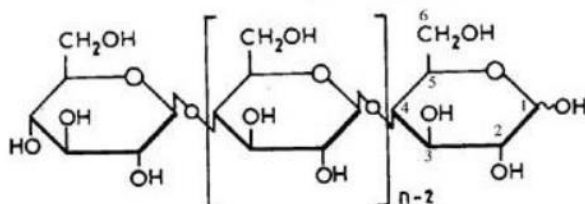
Živočichové nemají enzymy, které by dokázaly rozštěpit β 1,4 vazby mezi jednotlivými glukosovými jednotkami. Bakterie naproti tomu mají schopnost celulózu

štěpit a metabolizovat. Při hydrolytickém štěpení celulózy vznikají různé štěpné produkty (cellopentosa, cellotetrosa, cellotriosa, cellobiosa) až po glukózu. [2]

2.2.1 Celulóza

Krystalická povaha celulózy byla odhalena v roce 1913, kdy byl zaznamenán první rentgenový vzor z vláknenných svazků různých rostlin. Jeden z prvních molekulárních modelů celulózy byl navrhnut v roce 1937, spočíval v antiparalelních řetězcích zabalených do monoklinické buňky. Celulóza jako taková byla objevena v roce 1938 francouzským chemikem Anselmem Payenem, který izoloval celulózu z rostlinného materiálu a určil chemický vzorec celulózy. Polymerní struktura celulózy byla určena v roce 1920 Hermannem Staudingerem. V roce 1994 začalo studium přípravy celulóзовých nanovláken, které byly nakonec připraveny ve vodném prostředí. [2]

Celulóze přísluší vzorec $(C_6H_{10}O_5)_n$. Je to polysacharid, jehož základní stavební jednotkou je β -glukopyranóza spojená do polymeru 1,4 – glykosidovými vazbami. Tyto vazby udávají celulóze tyčinkovitý charakter. Celulózu tak tvoří šestičlenné cykly, zvané pyranóza. Obr. 2 zobrazuje chemickou strukturu celulózy. [3]



Obr. 2: Vzorec celulózy [4]

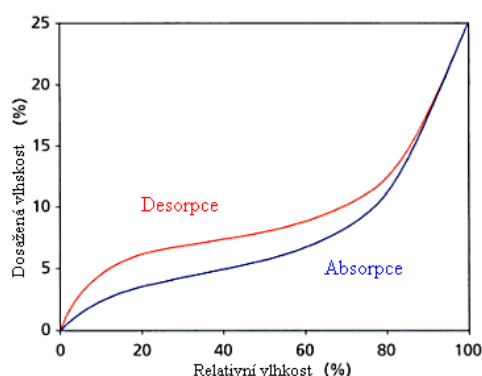
Navázáním velkého počtu základních jednotek β -glukózy vzniká makromolekula celulózy (u přírodní celulózy - 3 až 15 tisíc). β -glukopyranózová jednotka obsahuje 3 hydroxylové skupiny. Primární alkoholová skupina je umístěna na uhlíku C_6 a sekundární alkoholové skupiny jsou na uhlících C_2 a C_3 . Tyto – OH skupiny významně ovlivňují fyzikální, chemické a fyzikálně-chemické vlastnosti. Mezi těmito skupinami vznikají vazby vodíkových můstků, jednak jako intramolekulární vazby mezi – OH skupinami jedné makromolekuly, a jednak intermolekulární mezi – OH skupinami více makromolekul. Intramolekulární vodíkové můstky způsobují tuhost makromolekul a intermolekulární jsou příčinou nerozpustnosti celulózy ve vodě

a běžných rozpouštědlech (rozpouštědlo zruší vodíkové vazby, případně se na uvolněné hydroxylové skupiny naváže). [3]

Působením vazeb vodíkových můstků na sebe makromolekuly vzájemně energeticky působí. Velmi pevná vazba dvou molekul může nastat, jestliže obě molekuly budou mít řetězce rovné, paralelně umístěné vedle sebe a na všech místech, kde to prostorové důvody dovolují, vzniknou vodíkové můstky. [4]

Předpokládá se, že jedna makromolekula celulózy zasahuje do několika krystalických i amorfních oblastí vlákna. Volné alkoholické skupiny v amorfních oblastech vlákna mají schopnost poutat molekuly vody (pomocí vodíkových můstků). Tato schopnost je omezena, nedochází k rozpouštění celulózy, ale pouze k jejímu bobtnání. V krystalických oblastech jsou řetězce navzájem propojeny sekundárními vazbami, z nichž nejdůležitější jsou vodíkové můstky. Ty způsobují vysokou odolnost krystalických oblastí proti působení vody a rozpouštědel. [4]

Celulóza je skoro vždy materiál anizotropní. Proto jsou vlastnosti v různých směrech různé. Uspořádání molekulárních řetězců, jejich větší nebo menší stěsnání se rovněž projevuje. Měrná hmotnost se mění s vlhkostí a bobtnáním vlákna. Celulóza je v suchém stavu velmi silně hygroskopická, přijímá vlhkost ze vzduchu a adsorbuje ji až do dosažení rovnovážného stavu. Hodnota, na které se vlhkost v celulóze ustálí, závisí především na relativní vlhkosti vzduchu (viz Obr. 3). Na teplotě vzduchu, ale také na vlastnostech samotné celulózy. Sorpce vody celulózou se vysvětluje jako bobtnání amorfní části celulózy, přesněji vázání molekul vody na boční hydroxyly, které nejsou vázané vedlejšími vazbami na paralelní molekuly. [4]



Obr. 3: Sorpční a desorpční izoterma celulózy při 25 °C [4]

2.2.2 Využití celulózy

Vzhledem k dobré dostupnosti se celulóza hojně využívá v průmyslu. Po odstranění doprovodných látek ve dřevě (lignin, hemicelulóza, atd.) se získá surová celulóza. Celulóza je hlavní složkou papíru a rostlinných vláken z bavlny, lnu a konopí. Díky jejím vlastnostem, jako je přilnavost, pružnost, specifická hmotnost, se používá na výrobu papíru a textilií. Ve spotřebitelském průmyslu převládá použití celulózové lepenky. Dále se hojně používá jako balicí materiál a na přípravu hygienických potřeb. [5]

2.2.3 Deriváty celulózy

Celulóza je základní surovinou pro výrobu derivátů. Technicky důležité jsou estery a ethery celulózy.

Estery celulózy

Estery celulózy mají zajímavé vlastnosti. Především vynikají vysokými hodnotami pevnostních vlastností a spolu s tím i vysokou odolností vůči poškrábání. Jejich zajímavou vlastností je schopnost dosáhnout vysokého lesku následným leštěním. Výrobky z esterů celulózy mají samolešticí schopnost. Estery celulózy mají rovněž vysokou schopnost odolávat rázovému zatěžování, mají vysokou houževnatost. Voda pohlcená estery celulózy působí jako změkčovadlo. Snižuje jejich pevnost a tvrdost, na druhou stranu zvyšuje schopnost odolávat rázu čili zvyšuje jejich houževnatost. [6]

- Nitrát celulózy – vzniká nitrací celulózy směsí HNO_3 a H_2SO_4 (viz rovnice 1)
– pro nátěrové hmoty



- Acetát celulózy – získává se esterifikací hydroxylových skupin celulózy (reakci lze provést do prvního, druhého nebo třetího stupně vznikne tak monoacetát (C1A), diacetát (C2A) nebo triacetát (C3A) celulózy (viz rovnice 2)
– vzniká působením anhydridu kyseliny octové
– pro výrobu acetátového hedvábí



Ethery celulózy

Látky významné z hlediska výroby lepidel, zahušťovadel. Ethery celulózy rozpustné ve vodě se používají jako textilní pomocné prostředky (pro šlichty, apretury a zahušťovadla pro textilní tisk), pro prací prostředky, jako lepidla pro papír, tapety aj., jako stabilizátory při suspenzní polymeraci. [7]

Z alkaliceľulózy se připraví účinkem sirouhlíku xantogenát celulózy, který je základem tzv. viskózy. Získaná vlákna jsou základem viskózového hedvábí nebo se rovněž zpracovávají na umělou stříž. Používají se např. jako izolační materiály pro elektrické vodiče, k přípravě laků, k výrobě těsnění, trubek (lisováním nebo stříkáním).

- Methylcelulóza – některé – OH skupiny jsou nahrazeny skupinami – OCH₃

Oxidace celulózy

Během oxidační reakce dochází ke zkracování délky řetězce celulózy a hydroxylové skupiny – OH celulózy se oxidují nejprve na aldehydické skupiny – CH=O pak na karboxylové skupiny – COOH. Při vyšších teplotách přímá vzdušná oxidace celulózy produkuje oxid uhelnatý, oxid uhličitý a vodu. Tento druh poškozené celulózy, který je směsí obsahující kromě zplodin oxidačně odbouraných ještě původní celulózu, nazýváme oxycelulózou. Stejně jako hydrocelulóza, tak i oxycelulóza vykazuje zvýšenou rozpustnost v roztocích (ve vodě, v esterech a částečně v alkoholech). [7] [8]

Celulóza je velice citlivá k oxidačním činidlům, např. na roztoky chlornanů a peroxidu vodíku nebo na působení atmosférického kyslíku za přítomnosti roztoku hydroxidu sodného. Vznik oxycelulózy je spojován se zkracováním celulózového řetězce, což vede ke snížení pevnosti vláken (stejně jako u hydrolýzy). [7]

Rozlišují se dva typy oxycelulózy: kyselý a redukující. Kyselý typ oxycelulózy obsahuje převážně karboxylové skupiny – COOH. Vzniká při oxidaci v alkalickém prostředí (např. při špatném vyprání alkálie po alkalickém zpracování, hlavně když zboží přichází do styku se vzdušným kyslíkem). [6]

Redukující typ oxycelulózy vzniká v kyselém prostředí a obsahuje hlavně aldehydické skupiny – CHO. Tyto skupiny snadno přechází při další oxidaci na skupiny karboxylové. V praxi většinou vznikají oba typy oxycelulózy vedle sebe, nazývají se pak: smíšený typ oxycelulózy. [2] [6]

Příprava oxycelulózy:

1) Vzorek bavlněné textilie se vnoří do vodného roztoku NaClO (o koncentraci asi 50 g·l⁻¹ aktivního chlóru). Po 1 minutě působení se vzorek vyjme a vysuší v sušárně. Potom se vzorek důkladně promyje vodou. Aby byl chlór úplně odstraněn, může se antichlorovat několikaminutovým ponořením do 6 %-ního vodného roztoku NaHSO₃. Pak se vzorek opět dobře promyje vodou a vysuší.

2) Materiál se nejprve předupraví: předpírka, smáčení, bělení. Následuje vlastní oxidační proces: oxidace mokrou cestou v oxidační lázni (54 – 65 % HNO₃) + NaNO₂ (4 – 6 h, 110 °C). Potom následuje stabilizace močovinou. [6]



Použití oxycelulózy:

- medicína: obvazy na zranění, hemostatika, přilnavé materiály pro zastavení krvácení (náplasti), absorbovatelné chirurgické nitě – oxidovaná celulóza má schopnost modifikovat mikroklima v ráně
- kosmetika a farmacie: zahušťovací činidla při výrobě kosmetických a farmaceutických přípravků
- jiné oblasti průmyslu: deodoranty pro absorpční vycpávky (pleny, hygienické vložky), lubrikanty pro chirurgické rukavice, nosiče léků, superabsorbenty a stále se nalézají nové možnosti pro použití oxidované celulózy [9]

Působení alkálií na celulózu

Při působení alkálií dochází k fyzikálně-mechanickým změnám. Vlákno nejprve bobtná a přerušují se vodíkové můstky, bobtnání probíhá nejprve v amorfních oblastech a s rostoucí koncentrací alkálie i v krystalických oblastech. Působení alkálie na celulózu je zobrazena v rovnici 4.



Při působení alkálií se mění tvar vláken a jejich mechanické vlastnosti. Vlákna se také v alkáliích částečně rozpouštějí. Rozpustnost závisí na koncentraci zásady, na teplotě (roste s klesající teplotou) a na polymeračním stupni (klesá s rostoucím polymeračním stupněm). Při vyšších koncentracích alkálie dochází k tvorbě tzv.

alkalicelulózy. Ve vhodném prostředí se alkalixelulóza převádí na hydratovanou celulózu. Při těchto reakcích dochází k nevratným změnám v nadmolekulární struktuře, a tím i ke změnám fyzikálních vlastností. Při oxidačním poškození celulózy se snižuje její odolnost vůči degradaci v alkalickém prostředí.

Degradace redukujících oxycelulóz, obsahujících aldehydické – CHO nebo ketonové skupiny – CO –, probíhá již při normální teplotě relativně velmi zředěnými alkáliemi. [6]

Využití: mercerace, louhování

Hydrolyza celulózy

Působením minerálních kyselin (H_2SO_4 , HCl) dojde ke zkracování řetězců. Hydrolyza stejně jako další chemické reakce může probíhat buď v tuhé fázi, přičemž je reakce typicky povrchová, nebo ve fázi silně nabobtnané až tekuté, přičemž hydrolyza probíhá v celé hmotě celulózy. [4]

Jsou-li vlákna poškozená působením kyselin, zvyšuje se redukční schopnost celulózy, což lze vysvětlit tím, že se na narušených místech řetězce tvoří aldehydické skupiny, při oxidačním štěpení i skupiny ketonické a karboxylové. Tento druh celulózy, který je směsí různých odbouraných zplodin celulózy s vlastní nepřeměnnou celulózou, nazýváme hydrocelulózou. Hydrolyza se obvykle provádí kyselinou solnou nebo chlorovodíkem v bezvodém prostředí. K hydrolytickému štěpení dochází působením minerálních kyselin (např. při kyselení po alkalickém zpracování). [1]

Modifikace celulózy

Samotná celulóza je ve vodě nerozpustná díky existenci mnoha silných vodíkových vazeb, které se tvoří mezi jednotlivými vlákny celulózy. Substitucí celulózy dosáhneme toho, že vznikne modifikace celulózy, která je rozpustná ve vodě. Rozpustnost těchto celulózových polymerů je přisuzována zmenšenému počtu vodíkových interakcí. Mezi tuto modifikaci řadíme MC a HPMC.

Tyto modifikace mají velké uplatnění. Jsou součástí zahušťovadel, váží na sebe vodu, uplatňují se ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. [10] [11]

- ***Modifikace bavlny kyselinou akrylovou (AA)***

Úprava bavlněné tkaniny použitím kyseliny akrylové jako apretačního prostředku v přítomnosti NaH_2PO_4 a $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ katalyzátorů samostatně nebo ve vybraných kombinacích technikou klocování za sucha. Příslušná AA povrchová úprava bavlny za neutrálních podmínek (pH 7) stanovuje bezformaldehydovou cestu pro zachování jádra a povrchovou modifikaci bavlny s vylepšením fyzikálních a mechanických vlastností příslušného vlákna, příze či tkaniny. Vylepšení spočívá v přírůstku hmotnosti, změně vzhledu, textury a flexibility, nemačkovosti, zlepšení barvitelnosti. Mechanické analýzy, IR spektroskopie a SEM naznačují, že změny vlastností jsou přímé důsledky různých stupňů esterifikace bavlněné celulózy, povrstvení celulóзовého podkladu filmem z poly(akrylové kyseliny) a síťování celulóзовých molekulových řetězců na bavlněné vlákno skrz segmenty poly(akrylové kyseliny) se formující během procesu úpravy. [12]

- ***Modifikace bavlny pomocí roubování polyuretanem***

Chemická modifikace bavlny s použitím vázaných izokyanátů při reakci 4,4 difenylmetan diisokyanátu (MDI) s poly(propylen glykoly) s následným přidáním methylethyl ketoxim (MEKO). Chemická modifikace bavlny s vázaným polyuretanem, který byl připraven z postupných přírůstků PPG a MEKO vybraným blokátorem do MDI. Při upravené teplotě může vázaný polyuretan generovat volné izokyanáty a dále reaguje s hydroxylovou skupinou bavlněných tkanin. Polyuretan je také možno síťovat během procesu roubování. Tímto způsobem může upravená bavlna dosahovat vysokou stálost v praní a odolnost vůči pomačkání. [13]

- ***Úprava bavlněných textilií pomocí poly(N-vinyl-2-pyrrolidonu)***

Tato úprava je prováděna za účelem vylepšení jejich výkonnosti a antibakteriálních vlastností. Výsledky ukazují, že úprava bavlněných textilií 4 % vodným roztokem PVP o molekulární váze $10 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ s následným sušením při 85°C po dobu 5 minut s následným vytvrzením při 160°C po dobu 3 minut vede ke zlepšení zesílení i výkonnostních vlastností textilie jako jsou pružnost, pevnost v tahu a barvitelnost.

Následná úprava PVP zesíťované textilie s 5 % jódem v roztoku etanolu po dobu 5 hodin při 50 °C propůjčuje antibakteriální aktivitu proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. [14]

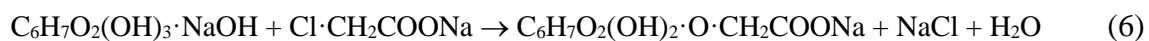
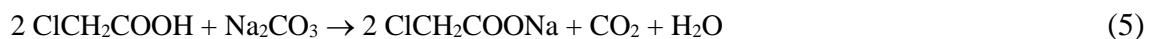
Navíc použití polymerní přísady s N,N-dimethylol 4,5 dihydroxyethylen močovinou se zlepšují některé vlastnosti upravených textilií jako je obsah dusíku, pevnost v tahu, barvitelnost. Současně klesá pružnost stejně jako index bělosti. Přičemž esterové zesíťení pomocí kyseliny citronové v přítomnosti PVP zlepšuje pružnost, pevnost v tahu, index bělosti. [14]

2.3 Karboxymethylcelulóza

Je derivát celulózy získaný chemickou modifikací přírodní celulózy. Karboxymethylcelulóza (CMC) je ve vodě rozpustný polysacharid obsahující karboxylové a hydroxylové skupiny.

2.3.1 Výroba

CMC byla prvně vyrobena v Německu na konci první světové války E. Jansenem, který celý proces výroby popsal v patentu z roku 1918. [15] Tento proces výroby CMC byl později vylepšen pány J.K. Chowdhury a F. Hopplerem. [16] [17] CMC se vyrábí z celulózy, převedené působením hydroxidu sodného na reaktivní alkaliceleulózu, která se esterifikuje chloracetátem sodným (viz rovnice 5 a 6). Chloracetát sodný se připravuje reakcí kyseliny monochloroctové s uhličitánem sodným. V druhé fázi přípravy CMC je možno použít i kyselinu chloroctovou nebo její sodnou sůl. [17]



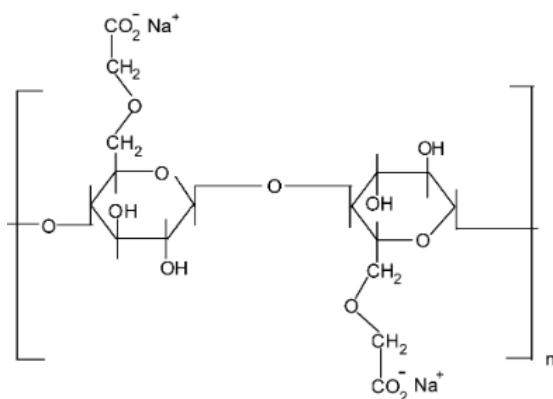
Samozřejmě je potřeba rozpouštědlo, volba rozpouštědla ovlivňuje nejen reakce, ale i strukturální rysy výrobků. Pokud tyto dvě reakce nepřivedou všechnu celulózu na CMC, mohou po reakci CMC zůstat některá nezreagovaná rezidua. Přítomnost nezreagovaných reziduí v CMC je známo dlouho. Již v roce 1959, byly nalezeny bobtnající tělesa nebo gelové částice v karboxymethylcelulóze, které jsou konečnou fází bobtnání vláken, způsobené příliš slabou nebo příliš nepravidelnou etherifikací.

Nerozpuštěné vlákna a gelové částice jsou velmi nežádoucí v roztoku CMC, protože dodávají barevný nádech a zákal. Tato vlákna či částice mohou být izolovány například odstředováním nebo filtrací. [10]

2.3.2 Struktura

Struktura je postavená na $\beta(1,4)$ glukopyranózovém polymerním řetězci celulózy. Přípravou je možné dosáhnout různých stupňů substituce. Nejčastěji se však pohybují v rozmezí 0,5 – 1,5 funkčních skupin na jednu monomerní jednotku. Obecně jsou makromolekuly CMC kratší než makromolekuly nativní celulózy. Celulóza má na každé glukózové jednotce tři hydroxylové skupiny, které dokážou tvořit silné vodíkové vazby s vedlejšími makromolekulami a tím tvoří celulózu nerozpustnou. Za ideální strukturu CMC považujeme, když je jedna z hydroxylových skupin každé monomerní jednotky substituovaná. [12]

Karboxymethylové skupiny vyčnívají ze základního řetězce, a proto nedovolují hydroxylovým skupinám se dostatečně přiblížit a vytvořit vodíkovou vazbu s vedlejšími molekulami. To zapříčiňuje, že se voda může dostat mezi molekuly CMC. Makromolekuly se působením vody oddělují a hydratovaná CMC přechází do formy roztoku. Molekulární struktura CMC je uvedena v Obr. 4. [12]



Obr. 4: Vzorec CMC [10]

2.3.3 Vlastnosti CMC

Různé vlastnosti CMC závisí na třech faktorech: na molekulové hmotnosti polymeru, na průměrném karboxylovém obsahu na jednotku anhydroglukosy a na distribuci karboxylových substituentů podél řetězce polymeru. Nejdůležitější vlastností CMC je viskozita a flokulace (schopnost vysrážet nečistoty). Rozpustnost

CMC ve vodě a vodných roztocích solí je podmíněna přítomností alkálie. Sráží se v přítomnosti solí s oxidačním číslem 2 a 3. Náhradou alkalických iontů vodíkovými vzniká nerozpustná kyselá forma CMC. [13] [18] [19]

2.3.3.1 Viskozita CMC

Viskozita charakterizuje vnitřní tření (čím více je kapalina viskózní, tím větší má odpor k tečení). V závislosti na požadované aplikaci mohou být CMC roztoky připraveny v širokém rozsahu viskozit. Viskozita je obecně přímo úměrná průměrné délce řetězce nebo polymerizačnímu stupni. Čím vyšší je stupeň polymerace, tím vyšší je viskozita. Dále je viskozita závislá na koncentraci roztoku. Viskozita roztoků CMC se zvyšuje s koncentrací. Viskozita roztoků CMC je stabilní v široké škále pH. Obecně platí, že roztoky CMC vykazují maximální viskozitu a nejlepší stabilitu při pH 7 – 9. Nad pH 10 je patrný mírný pokles viskozity. Pod pH 4 převládá volná méně rozpustná kyselina CMC a viskozita se může výrazně zvýšit. Dalším faktorem, který ovlivňuje viskozitu roztoků CMC, je účinek anorganických solí. Na viskozitu CMC roztoku má vliv rozpouštědlo, chemická povaha použité CMC, ale i způsob, kterým je CMC rozpouštěna. Díky tomu, že je CMC silně hyroskopická má po přidání do vody tendenci vytvářet shluky, protože je ihned hydratovaná. Při míchání je třeba udržovat tekutinu v neustálém pohybu během celého rozpouštění. CMC se rozpouští velice dobře jak ve studené, tak i v teplé vodě. Viskozita rozpouštědla a rozpouštěné CMC je nižší při vyšší teplotě. Za normálních podmínek je tento účinek reverzibilní (tj. zvýšení nebo snížení teploty roztoku nemá žádný trvalý vliv na vlastnosti viskozity roztoku). Nicméně delším zahříváním při extrémně vysokých teplotách, se může CMC trvale degradovat (depolymerace), což má za následek snížení viskozity. CMC je rovněž pseudoplastická. To znamená, že zdánlivá viskozita se sníží při zvýšení smykové rychlosti, ale účinek je zcela reverzibilní. Jakmile se zastaví, viskozita se vrátí na její původní hodnotu. [10]

2.3.3.2 Stupeň substituce

Stupeň substituce (DS-degree of substitution) neovlivňuje jen rozpustnost molekuly CMC, ale i vlastnosti roztoku. DS je průměrným počtem karboxymethylových skupin na jednu anhydroglukosovou jednotku (pro nativní celulózu DS = 0, a pro zcela substituovanou DS = 3). Vyšší stupeň substituce zlepšuje

rozpuštnost CMC a stabilitu viskozity za přítomnosti solí nebo nízkého pH. [9] Většina výzkumů byla prováděna s CMC o stupni substituce 0,5 – 2,0. [9] [14] V průmyslu je nejčastěji využíván stupeň substituce nižší, a sice 0,4 – 1,4. [20] [21] V rutinní analýze je prováděno stanovení průměrné míry substituce především pomocí titrační a gravimetrické metody.

- **Stanovení stupně substituce titrací**

Z množství karboxylových skupin v jednotkové navážce lze spočítat hodnotu DS (poměr počtu navázaných karboxylových skupin a počtu stavebních jednotek). Hodnota hmotnosti připadající na jednu – COOH skupinu je rovna převrácené hodnotě obsahu karboxylových skupin ($\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$). Karboxymethylový obsah a stupeň substituce je vypočten na základě níže uvedených rovnic 7 a 8.

$$M_j = 58 \cdot DS + 162 \quad (7)$$

$$DS = 162 / (M_{\text{COOH}} - 58) \quad (8)$$

kde: M_j – průměrná molární hmotnost jedné stavební jednotky

M_{COOH} – průměrná hmotnost vzorku připadající na jednu karboxylovou skupinu

Absolutní hodnoty stupně substituce (DS) mohou být stanoveny titrací. [22]

Postup titrace: Část karboxymethylovaného produktu se rozpustí s 60 ml 95 % ethanolu za stálého míchání. Poté se přidá 10 ml 2 M kyseliny dusičné a směs se míchá po dobu 2 minut. Následně se směs zahřívá až do bodu varu po dobu 5 minut, poté je ještě 15 minut míchána a nechá se usadit. Poté, co se roztok usadí se supernatant (sraženina) odfiltruje a odloží. Sraženina se nejprve promyje 80 ml 95 % ethanolu, následuje promytí pomocí 80 % ethanolu, který byl zahříván na 60 °C, dokud se neodstraní kyselina a její soli. Sraženina se dále promyje methanolem a přelege do kádinky, která se zahřívá, dokud se odstraní alkohol. Kádinka se sraženinou se suší v sušárně při 105 °C po dobu 3 hodin. Asi 0,5 g kyseliny karboxymethyl celulózy se smíchá se 100 ml destilované a 25 ml hydroxidu sodného 0,5 N. Takto připravená směs se vaří po dobu asi 15 min. Poté se zahřátý roztok titruje 0,3 N kyselinou chlorovodíkovou za použití fenolftaleinu jako indikátoru. DS se poté vypočte dle rovnic níže. [22]

$$\%CM = [(V_0 - V_n) \cdot 0.058 \cdot 100] / M \quad (9)$$

$$Ds = 162 \cdot \%CM / [5800 - (57 \cdot \%CM)] \quad (10)$$

kde: %CM – karboxymethylový obsah, V0 – ml HCl použitá k titraci standardu, Vn – ml HCl použitá k titraci vzorku, N – normalita použité HCl, M – množství vzorku (g), a 58 – molekulová hmotnost karboxymethylové skupiny

2.3.3.3 Biodegradabilita a kompatibilita

CMC nemá žádný negativní vliv na životní prostředí. Rychlost degradace závisí na molekulové hmotnosti. CMC je kompatibilní se širokou škálou neionogenních derivátů celulózy. Při výrobě směsí je vhodné zvolit takový derivát, který má přibližně stejnou hodnotu viskozity jako má CMC. [13] Dermatologické a toxikologické studie podle nezávislých laboratořích ukazují, že sodná sůl CMC není toxická pro bílé potkany, psy, morčata, nebo lidské bytosti. Testy na lidské pokožce ukázaly, že sodná sůl není dráždivá ani senzibilizující. [23]

2.3.4 Využití CMC

Nejvíce je CMC používána ve formě sodné soli, která je známa pod několika názvy např. celulózová guma, sodný celulózový glykolát, carboxymethocel či collocel. Jsou známy nízko substituované typy, které jsou rozpustné v alkáliích nikoli však ve vodě. [24] [25] Rovněž jsou známy vysoce substituované formy, které jsou nerozpustné v alkáliích či vodě, ale jsou rozpustné v organických rozpouštědlech. Kromě sodné soli CMC existují další soli s podobnými vlastnostmi např. draselná či amonná sůl, obě tyto soli jsou rozpustné ve vodě. Mezi nerozpustné soli, které byly dosud zkoumány, patří soli s obsahem např. olova, stříbra, rtuti a hliníku (bezbarvé soli), dále existují soli s obsahem mědi či niklu (modré zbarvení) a soli s obsahem železa (červené zbarvení). [26]

Tento derivát celulózy nachází uplatnění v mnoha aplikacích v různých oblastech jako je např. papírenský, textilní, potravinářský, kosmetický, chemický a farmaceutický průmysl. CMC se používá jako ochranný koloid a zahušťovadlo do disperzí ve vodných rozpouštědlech. Dále také jako pomocný prostředek při výrobě lepidel nebo jako stabilizační a redukční činidlo. Je využívána pro řízené uvolňování léčiv, mikrogelové matrice či nový typ náplastí. Díky lepivým vlastnostem je rovněž využívána jako bioadhezivní materiál zejména jako mucoadhezivní polymer pro nosní dutiny. [25] V textilním průmyslu se CMC začala využívat pro svou vysokou viskozitu a filmotvorné vlastnosti. Využití sodná sůl CMC našla např. v tiskařských pastách [27], povrchových úpravách či mazivech.

CMC je klíčovou složkou v pilulkách pro řízené uvolňování léčiv a ve výrobě produktů pro osobní hygienu. Nevýhodou je nízká odolnost proti hnilobě, škůdcům a světlu. Karboxymethyl celulóza se rovněž používá při zahušťování potravin např. při výrobě zmrzliny, sirupů, pudinků atd.

2.4 Sítování CMC

Pod pojmem sítování rozumíme vzájemné spojování polymerních řetězců hlavními a vedlejšími valencemi na „nekonečně“ velké makromolekuly. Struktura makromolekul CMC s početnými funkčními skupinami podél řetězce je pro sítující reakce velmi příznivá. Jako reaktivní centra přicházejí v úvahu především volné hydroxylové skupiny. Tvorba dostatečně stabilních síťových struktur je výsledkem reakcí činidel poskytujících můstky mezi sousedními makromolekulárními řetězci.

Zvýšení stupně zesílení systému vyúsťuje v stabilnější gel. Nicméně vyšší stupeň sítování vytváří křehčí strukturu. Optimálním stupněm sítování lze dosáhnout relativně silného, a přitom pružného hydrogelu. [23]

Existuje více způsobů sítování – fyzikální (termické), chemické a radiační.

2.4.1 Chemické sítování CMC

Struktura makromolekul CMC s početnými funkčními skupinami podél řetězce je pro sítující reakce velmi příznivá. Jako reaktivní centra přicházejí v úvahu především volné hydroxylové skupiny, a úměrně stupni substituce také karboxylové skupiny. Tvorba dostatečně stabilních zesílených struktur je výsledkem reakcí činidel poskytujících můstky mezi sousedními makromolekulárními řetězci. [28] Vzhledem k velké délce polymerních řetězců stačí zcela malé množství sítujícího činidla, aby se dosáhlo nerozpustnosti ve všech rozpouštědlech. Potřebné množství sítujícího činidla je tím menší, čím větší je relativní molekulová hmotnost polymeru. Zesílení makromolekulárních látek vede ke zhoršení rozpustnosti a tavitelnosti, zvýšení tvarové stálosti za tepla i odolnosti vůči chemikáliím, snížení permeability a zlepšení elektroizolačních vlastností, zvláště za zvýšené teploty. Čím hustší je zesílení, tím obtížněji vnikají do polymeru nízkomolekulární látky. Klesá bobtnavost, navlhavost a extrahovatelný podíl. [29]

Již v roce 1981 byla provedena studie, která se zabývala výrobou zesíťované CMC o vysoké sorpční kapacitě. Jednalo se o modifikaci práškové nebo granulované alkalické soli CMC působením kapiček mlhy vodného roztoku hlinité soli

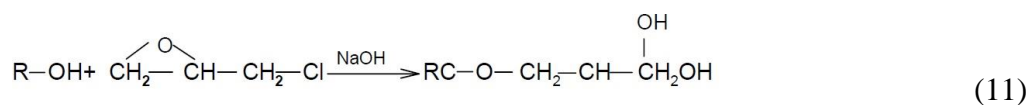
v podstechiometrickém množství za stálého míchání, využívající rychlé difúze roztoku v mírně nabobtnané struktuře částic za současné reakce iontů Al^{+++} s makromolekulárními řetězci postupující od povrchu směrem ke středu částic za přechodu do nerozpustného zesítěvaného stavu o vysokém stupni bobtnání a retenci vody a vodných roztoků solí. [28]

CMC může být chemicky síťována všemi činidly, která jsou bifunkční s ohledem na celulózu. Stabilní struktura a efektivní bobtnání hydrogelů na bázi celulózy často vyžaduje chemicky zesítěnou síť. Několik difunkčních molekul je využito jako síťovadlo pro celulózu nebo její deriváty, aby kovalentně vázaly různé polymerní molekuly hydrofilní trojrozměrné sítě. Bobtnání hydrogelů může být modulováno měněním rozestupů mezi síťováním, změnou molekulové hmotnosti (ethylenglykolu) diglycidyl éteru nebo vkládání poly(ethylenglykolu) jako rozpěry řetězců makromolekuly při použití divinylsulfonu (DVS) jako síťovadla. Nicméně, vzhledem ke své toxicitě DVS vyžaduje odpovídající bezpečnostní měření během výrobního procesu a přísné kontroly kvality finálního výrobku (tj. všechny nezreagované DVS musí být extrahovány z gelu před tím, než může být použit). [30]

Epichlorhydrin, aldehydy, činidla na bázi aldehydů, deriváty močoviny, karbodiimidy a multifunkční karboxylové kyseliny jsou nejčastěji používaná síťovací činidla pro tvorbu celulózových hydrogelů. [30]

2.4.1.1 Síťování CMC pomocí epichlorhydrinu

Síťování CMC působí jako prevence nebo zpomaluje rozpouštění a zlepšuje některé fyzikální vlastnosti. Epichlorhydrin (E) je běžně používaný jako síťovací činidlo, které účinně stabilizuje zemědělské zbytky pro přípravu celulózy (jejích derivátů) a zlepšuje stabilitu funkčních skupin. Po etherifikaci při teplotách do 70 °C následuje síťování pomocí epichlorhydrinu za přítomnosti hydroxidu sodného (do 70 °C) viz rovnice 11. Celulózové/CMC hydrogely se rovněž vyrábí v NaOH/močovino vodném systému s použitím epichlorhydrinu. Bylo zjištěno, že rozpustnost CMC ve vodě se postupně snižuje se zvyšující se reakční teplotou až po nerozpustný polymer. [28]



Epichlorhydrin se používá k výrobě syntetického glycerolu, epoxidových pryskyřic, vodou ředitelných pryskyřic, epoxidových nátěrových hmot a iontoměničů. Hlavními toxickými účinky jsou lokální podráždění a poškození centrální nervové soustavy. Vyvolává rakovinu nosní dutiny inhalační cestou a nádory žaludku potravní cestou. Při kontaktu s kůží způsobuje senzibilizaci a poleptání. [28]

2.4.1.2 Síťování CMC pomocí karbodiimidů

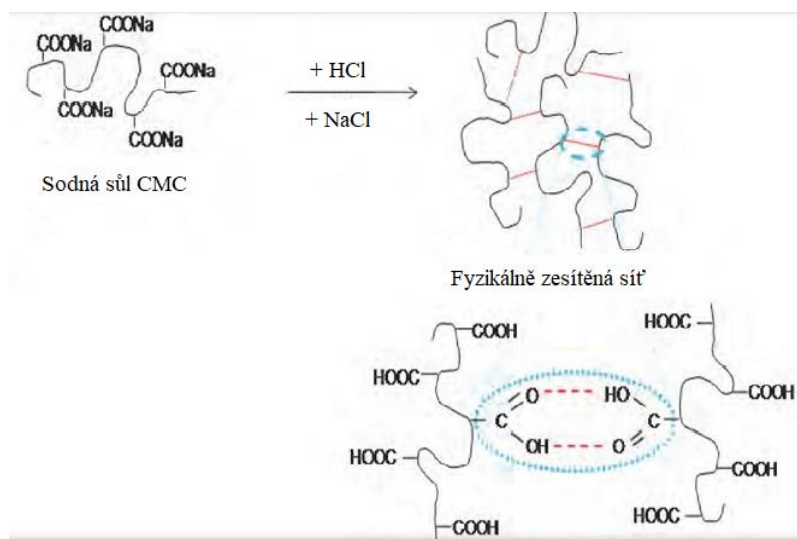
Jsou popsány studie s využitím karbodiimidů známých nekonvenčních síťovacích činidel. Zvláště pak použití karbodiimidů pro síťování CMC ve formě sodné soli. Karbodiimidy způsobují tvorbu esterových vazeb mezi makromolekulami celulózy, ty se poté přeměňují na deriváty močoviny s nízkou toxicitou (karboimid reaguje s karboxylovými skupinami za vzniku aktivovaného esterového meziprojektu, funkční skupina – $\text{N}=\text{C}=\text{N}$ –). Ve skutečnosti má výrobek získaný síťováním CMC pomocí karbodiimidů ve vodném roztoku vzhled želatiny s vyšší či nižší viskozitou, v závislosti na konkrétním použitém karbodiimidu. Takto vyrobený hydrogel je biodegradabilní chemický gel. Gel je definován jako chemický, pakliže je síť stabilizována pomocí silných kovalentních vazeb nebo prostřednictvím polyfunkčních molekul. Takovéto gely se vyznačují dobrou chemickou i mechanickou stabilitou. [31]

Byly pokusy na vytvoření chemicky síťované CMC s cílem, aby vznikl hydrogel s použitím divinylsulphonu jako síťovacího činidla. Nicméně CMC nelze použít samostatně kvůli dosažení nízké efektivitě síťování. U vysokého stupně substituce je většina vodíkových a hydroxylových skupin v poloze C6 nahrazena karboxymethylovými skupinami. Několik hydroxylových skupin na C6 a méně reaktivních hydroxylových skupin na C2 a C3 zůstává k dispozici pro síťovací reakci. Proto jen směs CMC s dalším polymerem může být prakticky přeměněna v hydrogel pomocí chemické síťovací metody. [32] [33]

2.4.1.3 Síťování CMC pomocí vodíkových vazeb

Hydrogely lze získat snížením pH vodného roztoku polymeru obsahujícího karboxylové skupiny. Příkladem hydrogelu tvořeného vodíkovými vazbami je CMC síť tvořená disperzí CMC v 0,1 M kyseliny chlorovodíkové. Mechanismus zahrnuje nahrazení sodíku vodíkem (v CMC) v kyselém roztoku, což podporuje vodíkové vazby (viz Obr. 5).

Vodíkové vazby vyvolávají pokles rozpustnosti CMC ve vodě a mohou vést k vytvoření pružného hydrogelu.



Obr. 5: Tvorba hydrogelové sítě díky intermolekulárním vodíkovým vazbám V CMC s nízkým pH

2.4.2 Radiačním zářením

Zářením vyvolané zesíťení a degradace polymerních vodných roztoků je způsobeno reakcí s vodou radiolytickými produkty, zejména – OH skupinami. První hydrogel pro obvazování ran, který byl připraven zářením, byl vynalezen v Polsku v roce 1986. Syntetizovaný hydrogel může být používán jako lék proti bolesti a k urychlení hojení ran. Výrobní technika kombinuje sterilizaci a síťovací proces současně, proto byla tato technika považována za průlom. Lugao přezkoumal uplatňování záření při přípravě hydrogelů, a ukázalo se, že technika radiace je vhodná pro tvorbu chemicky čistého hydrogelu s vylepšenými vlastnostmi. Navíc je tento proces snadno kontrolovatelný a flexibilní. [34] [35] [36]

Koncept produkce čistého CMC hydrogelu, aniž by obsahoval příměs jiných polymerů a bez přídavku zamořující látky s nízkou molekulovou hmotností inicioval zahájení aplikace ionizujícího záření. Ozařování polysacharidových materiálů vyvolává některé efekty v závislosti na druhu polymeru, parametrech ozařování, fázích materiálu při zpracování a další. Dvě hlavní reakce, které ovlivňují výsledné vlastnosti polymerů, jsou: (a) rozštěpení hlavního řetězce, což vede k snížení molekulové hmotnosti makromolekul a (b) zesíťení, opačný proces degradace, který vede k vytvoření makroskopického, nerozpustného materiálu. Výhodou CMC hydrogelů vyrobených

ionizujícím zářením je chemická čistota materiálu a jeho náchylnost k biodegradaci. [32]

Literatura uvádí, že biologicky rozložitelná CMC s vysokým stupněm substituce (př. 1,32) může být efektivně síťována při vysoké koncentraci CMC ve vodném roztoku, tak aby vznikl hydrogel, a to bez použití síťovadla. Od té doby byly zkoumány účinky času, koncentrace a rychlosti dávky na síťování ionizujícím zářením CMC s DS 2,2 ve vodném roztoku. Bylo zjištěno, že až 95 % podíl gelové části byl získán z 50 % a 60 % roztoku CMC, který byl ozařován elektronovým paprskem. Kromě toho může být zesítěná CMC narušena enzymem celulázou a tím se CMC hydrogel stává přátelským k životnímu prostředí. Stejně tak v předchozí studii bylo zjištěno, že sodná sůl CMC (DS 0.64) může být také síťována pomocí záření za účelem vzniku hydrogelu. [29]

Doposud hydrogely získané síťováním pomocí záření našly využití v mnoha oblastech, jako jsou biomedicínské prostředky, obvazy na rány a řízené uvolňování léků. V takových aplikacích jsou biologicky odbouratelné a biokompatibilní polymery většinou žádoucí. [29]

2.4.3 Fyzikální síťování

V posledních letech je zvýšený zájem o fyzikální nebo reverzibilní gely kvůli relativně snadné výrobě a nenutnosti použití síťovacích činidel. Pečlivý výběr hydrokoloidních typů, koncentrace a pH může vést k vytvoření široké škály gelových textur.

2.4.3.1 Termické síťování

V oblasti termo-reverzibilních hydrogelů je jedním z největších členů hydrofobně modifikovaná celulóza. Když jsou hydroxylové skupiny částečně nahrazeny methylovými skupinami nebo hydroxylpropylovými skupinami jsou některé vodíkové vazby zamezeny a výsledné deriváty se stávají rozpustné ve vodě. Vodné roztoky MC mají neobvyklou vlastnost vytváření reverzibilních fyzikálních gelů, a to díky hydrofobním interakcím při zahřátí nad určitou teplotu. HPMC má vyšší teplotu gelování než MC, vytváří tak pevnější gely s odpovídající substitucí a molekulovou hmotností. Což znamená, že gelace derivátů celulózy je výsledkem odeprání vstupu vody z těžce methoxylátových oblastí polymerů. [34]

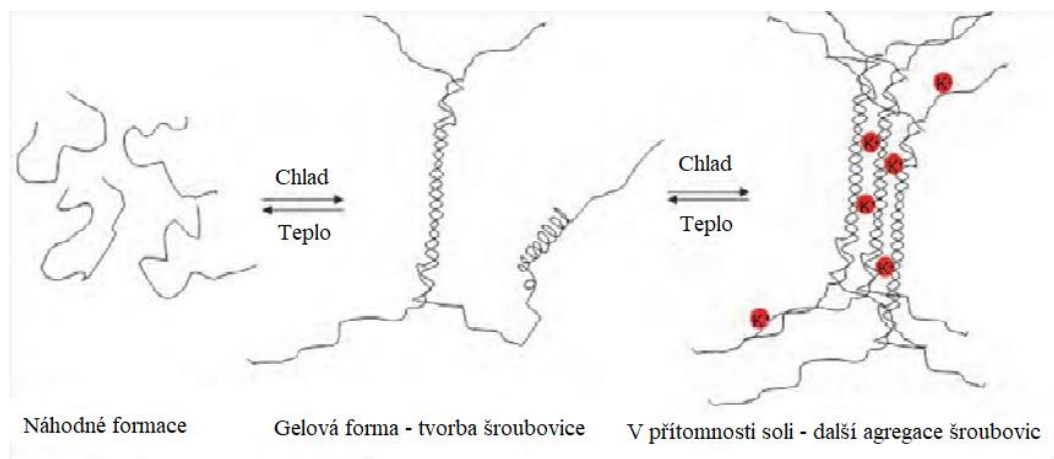
Zahříváním CMC s jistým podílem volných karboxylových skupin dochází k esterifikační reakci s hydroxylovými funkčními skupinami téže nebo sousední makromolekuly. Intermolekulární esterifikací tak vznikají zesíťené vazby značné stability.

2.4.3.1.1 Ohřívání/chlazení polymerního roztoku

Fyzikálně zesíťené gely jsou tvořeny při chlazení horkých roztoků želatiny nebo karagenanu (skupina lineárně sulfátových polysacharidů). Gel se formuje díky helix-formaci, sdružování šroubovic a formování spojovacích zón.

Transparentní poly(vinylalkoholové) hydrogelové filmy, vyrobené z vodných roztoků s různou koncentrací, byly syntetizovány metodou cyklického zmrazování-rozmrazování (0 až 37 ° C). [35] [37]

Fyzikální zesíťení ve formě vodíkových vazeb v oblasti krystalického polymeru posilují strukturu gelu. Fyzikální hydrogel lze získat vystavením roztoku PVA opakovaným cyklům mrznutí a rozmrazování, což vede k tvorbě krystalitů viz Obr. 6. [38] [39]



Obr. 6: Ochlazování horkého roztoku karagenanu

2.5 Hydrogely

Hydrogely jsou trojrozměrné, hydrofilní polymerní sítě, které mohou pojmout velké množství vody nebo biologických kapalin. Sítě jsou tvořeny z homopolymerů nebo kopolymerů a jsou nerozpustné v důsledku chemického síťování nebo fyzikálního

sítování, jako jsou spletnice či krystaly. Ty dávají síti strukturu a fyzikální integritu. Tyto hydrogely vykazují termodynamickou kompatibilitu s vodou, která jim umožňuje se zvětšit ve vodném prostředí. Základní vlastností pro toto neobvyklé chování hydrogelů je jejich přechod od skelného na pružný stav kdy při kontaktu s termodynamicky kompatibilním rozpouštědlem. Hydrogely připomínají přírodní živé tkáně více než jiné syntetické biomateriály. To je díky jejich vysokému obsahu vody a měkké konzistenci, která je podobná přírodní tkáni. Kromě toho vysoký obsah vody v materiálu přispívá k jejich biokompatibilitě. A proto lze hydrogely použít jako kontaktní čočky, membrány pro biosenzory, vyzdívky pro umělá srdce, materiály pro umělou kůži a zařízení pro doručování léků. [30]

Nejčastějším hydrogelem k dispozici na trhu jsou polymery akrylamidu a draslík/akrylátu, které bohužel nejsou biologicky odbouratelné. Nicméně, vzhledem k rostoucímu zájmu institucí a veřejného mínění v oblasti problémů ochrany životního prostředí, byl výzkum v nedávné době zaměřen na vývoj biologicky rozložitelného superabsorbentu, které by měly být přednostně získané z neškodných prekurzorů bezpečným způsobem výroby s ohledem k životnímu prostředí. [32]

2.5.1 Hydrogely na bázi celulózy

Celulóza a CMC jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné, takže jsou často používány v oblasti biomedicíny. Celulóza je bohatá na hydroxylové skupiny, které mohou být využity k přípravě hydrogelů s fascinujícími strukturami a vlastnostmi. Selektivní deriváty celulózy včetně methyl celulózy (MC), hydroxypropyl celulózy (HPC), hydroxypropylmethyl celulózy (HPMC) a karboxymethylcelulózy (CMC) byly použity k výrobě hydrogelů na bázi celulózy pomocí fyzikálního zesítení nebo chemického sítování. Sodná sůl CMC (NaCMC) jako amylosa s mnoha hydroxylovými a karboxylovými skupinami může absorbovat vodu a vlhkost, takže výsledný hydrogel má mnoho vynikajících vlastností, jako je například vysoký obsah vody, dobrá biodegradace, široká nabídka na trhu a nízká cena. V případě fyzikálně zesíťovaných gelů nejsou kovalentní vazby nebo poškození a zesíťovaná síť je tvořena pomocí iontové vazby, vodíkových můstků či asociativní interakce polymer/polymer. Obecně platí, že chemicky sítované hydrogely jsou připraveny pomocí sítování dvou či více polymerních řetězců s funkčními sítovadly nebo s UV světlem. Pro tvorbu CMC hydrogelu byly v minulosti kromě kyseliny jantarové použity i kyseliny jablečná a citrónová. [40]

Vysoce síťované hydrogely mají pevnější strukturu a méně bobtnají ve srovnání se stejným hydrogely s nižším síťovacím poměrem. Síťování brání mobilitě polymerního řetězce, a proto snižuje bobtnání. Optimálním stupněm síťování lze dosáhnout relativně silného, a přitom pružného hydrogelu. [40]

2.5.1.1 Bobtnání

Bobtnání je proces, u kterého je do objemu tělesa absorbována kapalina. Difundovaná kapalina vytváří sekundární vazby s řetězci makromolekul a tímto tyto řetězce oddaluje. [27]

Podíl síťování je jedním z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje bobtnání hydrogelů. Je definován jako poměr molů síťovacího činidla k molům polymerních opakujících se jednotek. Čím vyšší je poměr zesítění, tím více je začleněno síťovacího činidla do struktury hydrogelu. [27]

Vysoce síťované hydrogely mají pevnější strukturu a méně bobtnají ve srovnání se stejným hydrogely s nižším síťovacím poměrem. Síťování brání mobilitě polymerního řetězce, a proto snižuje bobtnání. [27]

Také chemická struktura polymeru může ovlivnit bobtnání hydrogelů. Hydrogely obsahující hydrofilní skupiny bobtnají více ve srovnání s polymery obsahující hydrofobní skupiny. Hydrofobní skupiny kolabují v přítomnosti vody, čímž se minimalizuje jejich působení na molekuly vody. Bobtnání hydrogelů šetrných k životnímu prostředí je ovlivněno specifickými podněty. Bobtnání hydrogelů citlivých na teplotu může být ovlivněno změnami teploty bobtnajícího media. Iontové síly a pH mají vliv na bobtnání hydrogelů citlivých na iontové síly a pH. Existuje mnoho dalších specifických podnětů, které mohou mít vliv na bobtnání ostatních ekologicky citlivých hydrogelů. [27]

Kinetiku bobtnání hydrogelů je možné klasifikovat jako řízené rozšiřování relaxace bobtnání. Když se voda do hydrogelu rozšiřuje rychleji, než se polymerní řetězce zrelaxují, jedná se o kinetiku difúzně řízenou. [27]

2.5.1.2 Aplikace

V případech, kdy je nutná nebo doporučená biologická rozložitelnost hydrogelu, jsou celulóзовé hydrogely zajímavé materiály, vzhledem k jejich nízké ceně, široké dostupnosti, biokompatibilitě a reakci některých celulóзовých materiálů vůči vnějším

podnětům. Tradičně se celulózové hydrogely používají jako absorbenty vody či na více inovativní biomedicínské aplikace.

Superabsorbenty pro osobní hygienu

Hydrogely na bázi sodné soli karboxymethylcelulózy (NaCMC) a hydroxyethylcelulózy (HEC), které jsou zesíťeny pomocí DVS, mají absorpční schopnosti srovnatelné s jinými superabsorpčními polymery (SAP) a vysokou retenční kapacitu vody.

Zařízení pro řízené uvolňování léčiv

Ethery celulózy se již dlouho používají ve farmaceutickém průmyslu jako pomocné látky v mnoha formulacích léčiv. Jejich použití v pevných tabletách umožňuje uvolnění léku během nabobtnání při styku tablety s fyziologickou kapalinou. Byly vyvinuty i sofistikovanější zařízení pro řízené uvolňování léčiv na bázi hydrogelů (jiné než tablety). Rovněž byly provedeny studie se zaměřením na prodloužené uvolňování bioaktivních molekul v průběhu dlouhého časového období (od hodin až týdnů). Řízené uvolňování orálně podávaných léků je obvykle založeno na silném kolísání pH při přechodu ze žaludku do střeva. Polyelektrolytové hydrogely na bázi celulózy jsou zvláště vhodné pro tuto aplikaci (např. aniontové hydrogely na bázi karboxymethylcelulózy, které byly v poslední době zkoumány pro cílené uvolňování léčiv do tlustého střeva). [41]

Krytí ran

Zánět, autolytické čištění, granulace tvorba tkáně a re-epitelizace jsou procesy, které se běžně vyskytují při hojení ran. Vhodné obvazy jsou určeny pro podporu hojení a zároveň chrání ránu před infekcí. To je důležité zejména v případech chronických ran (např. vředy), které se hůře léčí. Amorfni hydrogely jsou obvykle fyzikálně zesíťovány, jejich viskozita klesá při absorpci fyziologické tekutiny. Tyto gely mohou být baleny v trubkách nebo fóliích, v dalším případě mohou být gely vyztuženy gázou nebo polymerní sítovinou, aby umožnila snadné odstranění a zabránění zkapalnění gelu. Vzhledem ke své vysoké čistotě a retenční kapacitě vody je široce zkoumána bakteriální celulóza (BC) pro hojení ran. Řada obvazů na bázi BC jsou v současné době na trhu. Rovněž se na trhu vyskytují hydrogely na bázi derivátů celulózy (např. NaCMC), které jsou zahrnuty v některých komerčně dostupných hydrogelových obvazech, obvykle

v kombinaci s propylenglykolem, který pracuje jako zvlhčovač a konzervační látka. Předběžné, nepublikované výsledky podle současných autorů ukazují, že hydrogely na bázi celulózy zesítené s kyselinou hyaluronovou vyvolávají dobrou proliferaci keratinocytů (hlavní buňka pokožky), v ráně po škrábnutí (in vitro). [41]

V ošetřování ran a chirurgii se prosadily zejména dva anionaktivní deriváty celulózy obsahující funkční karboxylovou skupinu. Je to oxidovaná celulóza (6-karboxycelulóza, oxycelulóza) obsahující karboxylovou skupinu ($-\text{COOH}$) a karboxymethylcelulóza obsahující karboxymethylovou skupinu ($-\text{CH}_2\text{COOH}$). [41]

Vodní nádrže v zemědělství

Je rostoucí zájem o využití superabsorpčních hydrogelů v zemědělství. To je způsobeno především potřebou snížit spotřeby vody a optimalizovat vodní zdroje v zemědělství a zahradnictví. Nabobtnalý hydrogel může pomalu uvolňovat vodu (difúzně řízený mechanismus), v případě, že existuje gradient vlhkosti mezi vnitřkem a vnějškem materiálu. Cílem je učinit kultivace možné v suchých a pouštních oblastech světa, kde je nedostatek vodních zdrojů. Jedná se o tvorbu „xerogelu“ (tj. suchý hydrogel), ve formě prášku nebo granulí (přidat do půdy v oblasti v blízkosti kořeny rostlin). [36]

Hydrogely na bázi celulózy se perfektně hodí do současného trendu se rozvíjet alternativy superabsorpčních hydrogelů na bázi akrylátů, které by byly šetrné k životnímu prostředí. [36]

Potravinové plnidla

Podobně jako superporézní hydrogely na bázi akrylátů, které velmi rychle bobtnají ve vodných roztocích, nové hydrogely na bázi celulózy, získané zesítením vodných směsí NaCMC a HEC, se ukazují jako velmi atraktivní pro výrobu potravinových plnidel. Ve skutečnosti tyto hydrogely mají vysokou biokompatibilitu, s ohledem na střevní tkáň, jsou pH citlivé a zadržují vodu. I když polyaniontový charakter sítě NaCMC poskytuje vyšší schopnost bobtnání při neutrálním pH (spíše než v kyselém pH) podíl bobtnání získaný v kyselém pH, může být stále významný pro použití hydrogelu jako plnivo žaludku. [36]

2.6 Modifikace CMC pomocí nanočástic

Význam nanomateriálů a nanotechnologií prudce vzrůstá vzhledem k širokému aplikačnímu potenciálu a použití v různých průmyslových odvětvích, konzumních produktech a zdravotní péči. V biomedicině přináší nanotechnologie doslova revoluci, neboť jejich produkty mají schopnost pronikat k orgánům a tkáním s jejich následným ovlivněním. Některé nanomateriály jsou natolik malé, že mohou snadno pronikat do jednotlivých buněk. Takže mohou fungovat jako nosiče léčiv, nosiče kontrastních látek pro zobrazování tkání nebo diagnostiku některých onemocnění. Nanomateriály se, podle počtu rozměrů, v nichž nabývají hodnot pod 100 nm, mohou vyskytovat ve formě nanočástic, nanovláken a nanovrstev. Nejširší aplikační využití a s tím i plynoucí vyšší pravděpodobnost expozice živých organismů mají právě nanočástice. Základní odlišností nanomateriálů od konvenčních chemických látek je velikost částic a jejich povrchu. S klesající velikostí částic nepřímo úměrně roste plocha jejich povrchu a volná Gibbsova energie, která odráží reaktivitu daných částic. [42]

2.6.1 Příprava nanočástic stříbra

Cílená příprava nanočástic stříbra není zdaleka vyřešeným úkolem současného výzkumu, čemuž odpovídá i rostoucí počet publikací na toto téma. Existují dva obecné principy výroby nanočástic kovů a tj. dispergační a kondenzační. [42] [43]

V současné době se nanočástice stříbra připravují spíše druhou metodou, která je založena na chemické redukci rozpustné sloučeniny stříbra za vzniku stabilních nanočástic stříbra. V minulosti se stříbro připravovalo borohydridovou redukcí (NaBH_4) dusičnanu stříbrného (AgNO_3), průkopníky v této oblasti se stali Creighton, Blatchford a Albrecht. [44] V současnosti se spíše používá mírnější redukční činidlo a tj. citrátový anion. [45] Touto redukcí vznikají větší nanočástice stříbra, než tomu bylo u borohydridové redukce. Redispergací citrátového solu ozářením laserem lze snížit průměrnou velikost nanočástic na 5 – 10 nm a současně zvýšit jejich stabilitu. [46] Jako další redukční činidla lze rovněž využít např. peroxid vodíku, kyselinu askorbovou, formaldehyd a jeho deriváty, jednoduché cukry atd. [47] [48] [49] Nanočástice stříbra lze rovněž připravovat fotochemickou redukcí či radiolýzou. Z hlediska řízené syntézy nanočástic stříbra je zajímavé zjištění, že světlo může vyvolávat velikostní a tvarovou transformaci již vyredukovaných nanočástic. [50] Při radiolýze vzhledem k vysoké energii použitého záření lze přímo ozařovat vodný roztok stříbrné soli bez nutnosti přidavku dalších látek, protože při ozařování vysoce energetickým zářením dochází

k tvorbě hydratovaných elektronů a atomárního vodíku schopných redukovat ionty stříbra. Současná tvorba – OH radikálů, které částice stříbra reoxidují, celý redukční děj zpomaluje, přičemž výsledný pozvolný růst nanočástic poskytuje téměř monodisperzní soustavy s velmi malými částicemi. [51]

2.6.2 Antibakteriální aktivita nanočástic stříbra

Iontové stříbro vykazuje antimikrobiální aktivitu proti širokému spektru mikroorganismů. V důsledku toho je stříbro obsaženo v mnoha komerčně dostupných zdravotnických výrobcích. Použití stříbra se rychle vyvíjí zejména v oblasti hojení ran (obvazy s obsahem stříbra). Rány totiž často poskytují příznivé prostředí pro kolonizaci mikroorganismů, které prodlužují dobu hojení či způsobují vznik infekce. Nicméně existují obavy spojené s nadužíváním stříbra a následným vznikem bakteriální rezistence. Dosud nebyl pozorován výskyt rezistence bakterií vůči koloidnímu stříbru, resp. nanočásticím stříbra. To může souviset s odlišným mechanismem působení různých forem stříbra na bakterie, kdy se nemohou uplatnit buněčné detoxikační mechanismy, které si živé organismy vyvinuly proti iontům těžkých kovů. Publikované výsledky studia antibakteriální aktivity nanočástic stříbra ukazují mimo jiné na fakt, že antibakteriální aktivita je silně závislá na velikosti nanočástic a vzrůstá s poklesem jejich rozměru. [52] [53] [54]

2.7 3D struktury vhodné pro proliferaci buněk

Konvenční kultivace buněk in vitro poskytují pouze dvourozměrný prostor pro buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci. Takový model však neodpovídá fyziologickému stavu. Proto se v oblasti tkáňového inženýrství v současné době rozšiřuje příprava a používání trojrozměrných nosičů. Současně s přípravou takového nosiče je pak možné přímo do materiálu či na jeho povrch nanést aktivní látky. Lyofilizované materiály mají potenciál jako systémy pro dodávání léčiv do ran. [55] [56]

Lyofilizace (vymrazování) je proces dehydratace obvykle používaný pro zachování netrvanlivých materiálů, nebo aby se materiál lépe přepravoval například: zlepšení stability labilních léčiv. Lyofilizace probíhá zmrazením materiálu a pak se snižováním okolního tlaku, dochází k sublimaci zmrazené vody v materiálu přímo z pevné fáze do plynné fáze. Vymrazování může trvat několik dní nebo dokonce týdnů, pokud sublimační proces není optimalizován. [56]

2.8 Modifikace pomocí Alaptidu

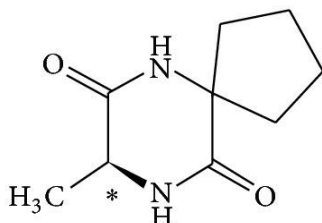
Jedním ze způsobů podání léčiva do organismu je transdermální aplikace, jejíž využití se v současnosti nebývale rozvíjí. Vnější vrstva kůže (stratum corneum) chrání tělo proti průniku cizorodých látek včetně léčiv. Byly však nalezeny různé způsoby překonání této bariéry. Jednou z možností je využití chemických permeačních enhancerů (CPE) neboli akceleratorů transdermální permeace. CPE mohou být považovány za excipienty specificky ovlivňující mezibuněčný prostor mezi korneocyty (modifikujícími korneocyty) a hydratací nebo denaturací keratinu. Heterogenita molekulárních struktur CPE může sloužit jako jednoduché vysvětlení jejich působení. Přesný mechanismus účinku CPE není doposud znám, ale CPE ovlivňují penetraci/permeaci léčiv, určených jak pro lokální působení, tak pro systémový účinek.

Ve vztahu k účinku alaptidu jako potenciálního CPE, je důležité poznamenat, že melanocyty významně ovlivňují tvorbu a funkci keratinocytů pomocí melanosomů. [57]

2.8.1 Alaptid

Alaptid – spirocyklický dipeptid, (5>8-methyl-6,9-diazaspiro[4,5]decan-7,10-dione) je sloučenina objevená v 80. letech v Praze.

Příprava látky, výroba postupy a terapeutické aplikace byly chráněny řadou patentů v České republice i v zahraničí (Kasafírek E. et al. Belg. Pat. 897843, 1984; CS Pat. 231227, 1986; Toxicol. Lett. 1986, 31, 189; CS Pat. 277132, 1992; CS Pat. 276270, 1992; Drugs Fut. 1990, 15, 445; Collect. Czech. Chem. Commun. 1992, 57, 179; Collect. Czech. Chem. Commun. 1993, 58, 2987; US Pat. 5,318,973, 1994; Collect. Czech. Chem. Commun. 1994, 59, 195).

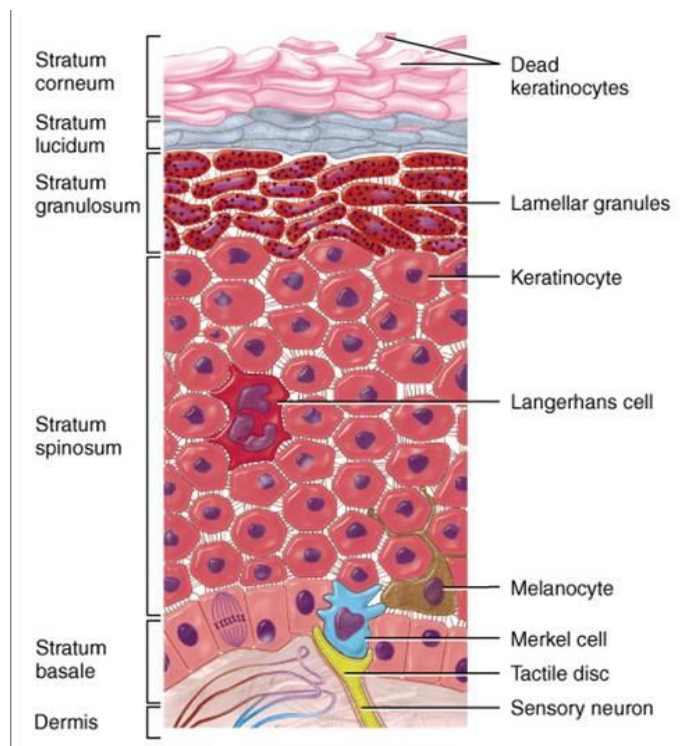


Obr. 7: Struktura s-alaptidu (zdroj: <http://tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=A-174001&name=ALAPTIDE>)

Alaptid je bílá krystalická sloučenina, obecně špatně rozpustná, stabilní na slunečním světle a skladovatelná při běžné teplotě.

Alaptid může být klasifikován jako analog inhibičnímu faktoru migrace makrofágů (MIF), také známému jako Pro-Leu-GlyNH₂, tj. L-prolyl-L-leucylglycinamid. Použití samotné MIF jako terapeutického činidla je nemožné kvůli jeho rychlé enzymatické hydrolýze. Alaptid byl vybrán z řady připravených spiroderivátů jako nejvýhodnějšího analogu MIF z hlediska enzymatické stability a jeho farmakodynamického profilu. Alaptid vykazuje významné léčebné účinky v různých terapeutických oblastech na experimentálních zvířecích modelech. Vliv alaptidu na epidermální regeneraci byl zkoumán v řadě testů. In vivo pokusy byly provedeny s použitím prasat, u kterých byl alaptid aplikován při experimentálním poškození, a byla pozorována rychlejší regenerace pokožky po aplikaci alaptidu. Podobně alaptid zrychluje obnovu experimentálního poškození kůže u potkanů. Alaptid pravděpodobně negativně ovlivňuje inhibici uvolňování melanocyt-stimulujícího hormonu, a tím zvyšuje koncentraci melanocytů v epidermis. Melanocyty významně ovlivňují tvorbu a funkci keratinocytů prostřednictvím melanosomů. Keratinocyty migrují ze stratum basale do stratum spinosum a ze stratum granulosum do stratum corneum, kde podporují regeneraci epidermis (viz Obr. 8). [57]

Alaptid na základě hojného počtu různých studií vykazuje velký potenciál pro léčbu či regeneraci lokálně poraněné kůže nebo sliznice. Alaptid však vykazuje nízkou rozpustnost, a tedy i bio dostupnost. Rozpustnost alaptidu ve vodě je 0,1104 g ve 100 ml, v ethanolu 0,1011 g ve 100 ml a ve směsi voda/ethanol je rozpustnost 0,3601 g ve 100 ml. [57]



Obr. 8: Schéma lidské kůže [58]

2.9 Sorpce iontů kovů

Konvenční způsoby odstraňování těžkých kovů zahrnují chemické srážení, iontovou výměnu, elektrodialyzaci, membránové separace, reverzní osmózu a extrakci rozpouštědlem. V současnosti se hledají nové, efektivní a ekonomické technologie, které zahrnují odstraňování toxických kovových iontů z odpadních vod (biosorpce), založené na vazebných kapacitách různých biologických materiálů s malými nebo žádnými náklady. [58]

Jak již bylo zmíněno dříve, CMC se sráží se v přítomnosti solí s oxidačním číslem 2 a 3. Náhradou alkalických iontů vodíkovými vzniká nerozpustná kyselá forma CMC. Je známo, že sodná sůl CMC je derivát celulózy, který je bezbarvý, bez zápachu a chuti, je fyziologicky inertní, chemicky stabilní, není nebezpečný pro zdraví a životní prostředí a je rozpustný ve vodě. Má také dobrou komplexační schopnost pro některé kovové ionty a je využívána jako makromolekulární komplexační činidlo pro selektivní odstranění mědi z vody v komplexotvorném mikrofiltračním procesu. [59]

Je známo, že ionty těžkých kovů jsou příliš malé, aby byly membránou zadrženy. V procesu komplexační-mikrofiltrace jsou nejprve ionty těžkých kovů

komplexovány makro ligandem, aby se zvýšila jejich molekulová hmotnost tak, že mají velikost větší než póry vybrané membrány, která je následně může zadržet. [59]

Vícemocné kovy mohou být vázány na různé typy funkčních skupin. Kovové ionty jsou na karboxymethylcelulózu vázány především díky – COOH a – OH vazbám. Dle studie Martyniukové a Więckovské [58], která se zabývala adsorpcí kovových iontů na huminové kyseliny, které byly extrahovány z hnědého uhlí, vychází, že se zvyšujícím se pH roste pravděpodobnost uskutečnění vazby přechodného kovu s karboxylovou skupinou a zvyšuje se také rychlost jejich interakcí. Při $\text{pH} < 5$ jen část celkového počtu – COOH skupin reaguje s kovovými ionty a při $\text{pH} 6 - 7$ jsou všechny karboxylové skupiny navázány na kovové ionty. [60]

Komplexy s kovy jsou většinou záporně nabité. Rozpustnost komplexů s vícemocnými ionty závisí na hmotnostním poměru obou složek. Čím je poměrné zastoupení kationtu vyšší, tím je rozpustnost komplexu nižší. V souladu s teorií HSAB (tvrdých a měkkých kyselin a zásad), Cu^{2+} a Pb^{2+} ionty interagují s CMC přes atomy O a N a tvoří tak stabilní komplexy. [61] [62] [63] [64] [65] [66]

3 Experimentální část

V této kapitole je v krátkosti popsán postup řešení práce, včetně metod přípravy, síťování a modifikací vzorků. Rovněž je popsána základní charakteristika metod hodnocení.

3.1 Použité výchozí materiály

- Sodná sůl CMC v práškové formě (CMC- Na^+ - MW 250 000, DS 0,7)
 - Od firmy VWR, katalogové číslo : 9004-32-4, Čistota 99,5 %
- Sodná sůl CMC ve vlákně formě (CMC- Na^+ - pH 6,5 – 7,0; DS 0,22 – 0,35)
- Kyselá forma CMC ve vlákně formě (pH 4,0 – 4,3; DS 0,36 – 0,38)
 - Obě vlákně formy CMC byly vyrobeny v poloprovozních podmínkách firmou Holzbecher s.r.o. metodou, která je popsána v kapitole o výrobě CMC. V obou případech se jedná o plošnou netkanou textilií typu spunlace o plošné hmotnosti $60 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$.



Obr. 9: Ukázka použité práškové sodné soli CMC



Obr. 10: Ukázka použité vlákně formy CMC

3.1.1 Další pomocné chemikálie

1,4-butanediol diglycidyl ether $\geq 95 \%$ (BDDGE) – Sigma Aldrich

Kyselina jantarová p.a. – Verkon

Kyselina citrónová $\geq 95 \%$ – Sigma Aldrich

Etylen-dimetakrylát $\geq 98 \%$ (EDMA) – Sigma Aldrich

2,2'-azobisisobutyronitril $\geq 98 \%$ (AIBN) – Sigma Aldrich

Kationaktivní prostředek (Syntefix R) – Enaspol a.s

Epichlorhydrin p.a. – Sigma Aldrich

Dusičnan stříbrný – Lachema n.p. Brno – ČSN 684421

Kyselina askorbová p.a. – Sigma Aldrich

Síran měďnatý pentahydrát p.a. – Lachner

Octan olovnatý p.a. – Lachner

Chlorid cínatý p.a. – Lachner

Sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium (XTT) – Thermo Fischer Scientific

N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate ≥ 98 % (PMS) – Sigma Aldrich

Yeast extract – Sigma Aldrich

Peptone G – Sigma Aldrich

SYTO 9 – Thermo Fischer Scientific

BSM (minerální médium) – Sigma Aldrich

Fibroblast Growth Kit-Low – ATCC

Fibroblast Basal Medium – ATCC

3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid (MTT) – Thermo Fischer Scientific

chlorid sodný p.a. – Verkon

chlorid draselný p.a. – Verkon

chlorid vápenatý bezvodý p.a. – Verkon

chlorid hořečnatý p.a. – Verkon

hydrogenfosforečnan sodný p.a. – Verkon

dihydrogenfosforečnan draselný p.a. – Verkon

3.2 Metody přípravy roztoků

Sodná sůl CMC byla použita v práškové formě (CMC- Na^+ , DS 0,7). Sůl byla rozmíchána ve vodě k dosažení koncentrace 20 či 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok byl rozmíchán pomocí laboratorního hřídelového míchadla Heidolph RZR 2051 po dobu 15 minut, poté se roztok ponechal 3 dny odležet, aby byl roztok homogenní a CMC se úplně rozpustila.

Další použitou variantou byla výroba filmů z rozpuštěné sodné soli CMC ve vlákenné podobě (pH 6,6; DS 0,35). Netkaná textilie byla rozmíchána ve vodě k dosažení koncentrace 17 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Do obou zmíněných variant bylo možné přidat glycerin, filmy poté byly tvárné a pružné.

3.2.1 Metody přípravy filmů

Z výše popsaných roztoků byly připraveny filmy vylitím přesně definovaného množství do plastové petriho misky. Množství použitého gelového roztoku bylo odvozeno od velikosti misek, tak aby se zachovala stejná tloušťka filmů po vyschnutí roztoku. Schnutí probíhalo za běžné laboratorní teploty i vlhkosti.

3.3 Sítování

Sítování bylo prováděno za účelem vytvoření hydrogelu s optimálními vlastnostmi. Preferovaným požadavkem všech experimentů bylo dosažení vysoké absorpce s co nejnížší rozpustností materiálu. Sítování bylo testováno na roztocích či filmech práškové formy sodné soli CMC.

3.3.1 Fyzikálními metodami

3.3.1.1 Mrazicí cykly

Prvním zvoleným způsobem sítování vzorků byla v práci použita metoda, spočívající na rozdílných teplotních skocích mezi chladicím boxem (-16 ± 2 °C) a pokojovou teplotou (20 ± 2 °C). Tato metoda byla zvolena s ohledem na studii, která je uvedena v kapitole o fyzikálním sítování, přičemž podmínky experimentu byly modifikovány.

Vzorky filmů o definované hmotnosti byly před umístěním do mrazicího boxu smočeny destilovanou vodou o definovaném objemu. Časový interval 1 cyklu trval 16 hodin (8 hod. v chladu, 8 hod. při pokojové teplotě). Počet testovaných cyklů 1 – 10.

3.3.1.2 Vysokou teplotou

Další způsob sítování spočíval v expozici vzorků filmů zvýšeným teplotám. Testované teploty byly 150 – 200 °C. Testován byl i vliv doby působení tepla na stupeň zesítní.

CMC je rozpustná ve vodě, a proto je nutno ji stabilizovat. Z důvodu předpokládaného použití v medicíně bylo nutné se vyhnout použití chemických snovadel, proto k zesítnění byla použita tepelná fixace. Která je založena na zesílení esterových skupin v CMC a odstranění karboxymethylových skupin z CMC.

3.3.2 Chemickými činidly

3.3.2.1 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) [67]

V experimentu byl pro přípravu filmů využit roztok čisté CMC ($30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), 1,4 butanediol diglycidyl ether a 10 % roztok persíranu draselného ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). BDDGE byl vůči CMC a persíranu dávkován v různých koncentracích (do 20 ml roztoku CMC bylo přidáno 0,2 ml persíranu draselného a 0,02 – 1 ml BDDGE). Reakční teplota 80°C po dobu 1 hodiny.

3.3.2.2 Karboxylové kyseliny

Karboxylové kyseliny byly pro síťování zvoleny díky jejich počtu – COOH skupin. Pro síťování je zapotřebí, aby kyseliny, kterými chceme dosáhnout zesíťení, měly 2 a více – COOH skupin. Při reakci karboxylových kyselin a CMC dochází k tzv. esterifikaci. K reakci byly použity kyselina citrónová a jantarová o různých koncentracích. Reakční teploty 130°C na dobu 10 minut, poté se teplota snížila na 80°C po dobu 1 hodiny. Testován byl vliv použitého množství kyselin na stupeň zesíťení ($0,015 - 1,00 \text{ g}/0,045 \text{ g CMC}$).

3.3.2.3 Kationaktivní prostředek

KP není stejně jako EDMA + AIBN klasické síťovadlo, ale díky jeho použití dojde k deaktivaci – COOH skupin což omezuje přístup vody k CMC. Použité koncentrace KP $10 - 100 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Film CMC byl v roztoku KP, u všech testovaných koncentracích, ponořen po dobu 1 hodiny.

3.3.2.4 Etylen-dimetakrylát/2,2'-azobisisobutyronitril (EDMA/AIBN) [68]

Mezi síťovacím činidlem EDMA a aktivátorem AIBN došlo k radikálové polymeraci. Při této reakci došlo k aktivaci dvojné vazby molekuly monomeru. AIBN se důsledkem zahřátí v horkovzdušné sušárně (70°C) rozpadlo na radikály, které zanikly a vytvořily se dvojné vazby nenasyceného monomeru. Rychlost celé polymerace je závislá na času rozpadu aktivční látky, teplotě a stabilitě jednotlivých radikálů. Sledován byl vliv reakční doby na stupeň zesíťení (1 – 10 hodin).

3.3.2.5 Epichlorhydrin

Pro porovnání byl proveden i experiment s epichlorhydrinem. Bylo smícháno 5 g suchého granulátu NaCMC a 50 g 17,5 % hydroxidu sodného (NaOH). Tento roztok bylo zapotřebí zahřát na 50 °C a za stálého míchání zahřívat po dobu 20 minut. Poté se do zahřáté směsi přidalo 50 g epichlorhydrinu a 50 g amoniaku (NH₃). Reakční teplota 40 °C po dobu 4 hodin. Výsledný gel bylo nutné přefiltrovat pomocí ethanolu.

3.3.3 Radiační

3.3.3.1.1 Sítování gama zářením

Ozařování vzorků neprobíhalo na akademické půdě TUL, ale ve spolupráci s firmou ÚJV Řež, a.s. Použit byl intenzivní zdroj úzkého svazku gama záření radioizotopu ⁶⁰Co v ochranném obalu. Sítování pomocí gama záření bylo provedeno na vzorcích filmů, roztoků i netkaných textilií. Dávky ozáření byly stanoveny na 5, 10, 15, 20 a 25 kGy.

3.3.3.1.2 Sítování plazmatem

Sítování bylo provedeno v kyslíkové atmosféře. Byly použity dva druhy plazmatu pro porovnání, a to přesněji atmosférická (od firmy MSV) a vakuová plazma (RF PA-CVD/MS). Doba, po kterou byly vzorky plazmovány byla v případě vakuové plazmy 1 – 90 s. (tlak 13 Pa, výkon zdroje 26 W, předpětí 250 V, průtok plynu 15 SCCM (cm³_[t=25°C]/min).

3.4 Příprava 3D mikroporézní struktury

V první studii byl použit laboratorní lyofilizátor Krista, typ Epsilon 2 - 6D, nosiče o celkové ploše 0,27 m² (VUOS a.s.). Všechny další experimenty byly již zhotovovány pomocí lyofilizátoru Telstar lyoQuest -85 (TUL). Lyofilizace byla provedena na vzorcích filmů, roztoků i netkaných textilií. Mimo podmínek lyofilizace (tlak, čas, teplota) na výslednou strukturu materiálu má výrazný vliv stupeň substituce, doba ponoření a forma CMC.

3.5 Modifikace pomocí nanočástic stříbra

Modifikace byla provedena na vzorcích roztoků, netkaných textilií a popřípadě dalších substrátů, na které se nanese roztok CMC. V rámci této studie bylo pracováno s krystalky dusičnanu stříbrného (AgNO₃), který byl rozpuštěn ve vodě či v roztoku

CMC. Testované koncentrace $0,1 - 2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Redukce nanočástic stříbra z dusičnanu stříbrného byla provedena různými způsoby:

1) teplem (180°C a 200°C)

2) UV světlem v uzavřené komoře s využitím žárovky Osram Ultra Vitalux 300 W E27 (UVA ($315 - 400 \text{ nm}$) $13,6 \text{ W}$, UVB ($280 - 315 \text{ nm}$) $3,0 \text{ W}$) či běžného denního světla.

- Osram Ultra Vitalux: $I = 204,00 [\text{W}\cdot\text{m}^{-2}]$

Pro porovnání:

- Denní světlo (zima): $I = 300,00 [\text{W}\cdot\text{m}^{-2}]$

- Denní světlo (zamračeno): $I = 100,00 [\text{W}\cdot\text{m}^{-2}]$

3) kyselinou askorbovou ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$).

3.6 Příprava vzorků pro sorpci iontů kovů

Normovaná doprovodná tkanina z polyesterové stříže (ČSN 80 01 08) byla povrstvena vodným roztokem CMC, vzorek se následně nechal přibližně 5 minut stát. Poté byl proveden odmačk pomocí fuláru Werner Mathis AG CH - 8156 při rychlosti $1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ a tlaku 4 bary. Následně byl vzorek opět umístěn do sušárny, kde zůstal při teplotě 105°C do dosažení konstantní hmotnosti.

Pro účely těchto experimentů byla použita sodná sůl CMC s molární hmotností 250 000, střední viskozitou a stupněm substituce 0,7 a 0,9. Byly použity roztoky sodné soli CMC s koncentrací $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. K přípravě roztoků byla použita destilovaná voda.

3.6.1 Vlastnosti použitých sloučenin

3.6.1.1 Vlastnosti síranu měďnatého

Síran měďnatý (CuSO_4) je nejběžnější sloučenina mědi. Pentahydrát síranu měďnatého je znám pod názvem modrá skalice. V bezvodém stavu tvoří bílý prášek, který přijímáním vody modrá. Proto se jej užívá k důkazu vody v organických kapalinách nebo jako sušidla. Síran měďnatý je přirozeně se vyskytující sloučenina, nerozkládá se při normálních podmínkách prostředí. Je silně reaktivní s jinými kovy, jako je ocel, železo a hořčík. Smrtelná dávka pro člověka je 50 g.

3.6.1.2 Vlastnosti octanu olovnatého

Octan olovnatý trihydrát ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) se vyskytuje ve formě bezbarvého či bílého prášku, granulí nebo krystalů. Má slabě zapáchající po kyselině

octové a nasládlou chuť. Je dobře rozpustný ve vodě a glycerolu, hůře pak v ethanolu a acetonu. Je velmi nebezpečný: 2 – 3 g vyvolají těžkou otravu. Smrtelná dávka pro člověka je 20 – 25 g.

3.6.1.3 Vlastnosti chloridu cínatého

Chlorid cínatý (SnCl_2) je bílá krystalická látka rozpustná ve vodě. Běžně se používá ochucovadlo, antioxidant a redukční činidlo používané především v nápojích obsahujících oxid uhličitý. Byly u něj prokázány nežádoucí účinky: při pokusech na zvířatech vykázal chlorid cínatý celou řadu negativních vedlejších účinků – odvápnění kostí, poruchy krevního obrazu, hromadění cínu ve slezině, záněty a poškození vnitřních orgánů a podobně. Smrtelná dávka pro člověka je 50 g. [60]

3.7 Metody hodnocení

3.7.1 Měření obsahu či uvolňování stříbra

3.7.1.1 ICP (OES, MS)

K analýzám byly využity dva iontové chromatografy Perkin Elmer Optima 2100 DV a DIONEX ICS 90. Jedná se o spektrometrii s indukčně vázanou plazmou. Měření anorganických látek, kontaminantů ve velmi nízkých koncentracích. [69]

- **ICP OES:** Základem ICP analyzátoru je radiofrekvenční generátor pracující na frekvenci 27 MHz nebo 40 MHz. Výkon tohoto generátoru se pohybuje kolem 1500 W a je vyzářen cívkou, v jejíž ose je umístěn křemenný „plazmový hořák“. Tímto hořákem protéká argon vysoké čistoty (zpravidla 99,999 %). Pro „zapálení“ plazmy je do prostoru hořáku generován vysokonapěťový jiskrový výboj. Tím vznikne primární ionizační stopa. Uvolněné elektrony jsou urychleny elektromagnetickým polem uvnitř cívky a při srážce s atomy argonu způsobují následnou ionizaci. Vzniklá plazma je prostorově vázána a energeticky dotována polem uvnitř cívky. Plazma se vyznačuje velmi vysokou teplotou (v nejteplejší části i více než 10 000 K, většinou však 7 000 K až 8 000 K). Do této plazmy je pomocí injektoru přiváděn vzorek, který je předtím pomocí zmlžovače (nebulizéru) převeden na aerosol. Aerosol se dostává do mlžné komory, kde se oddělí větší kapičky od menších, a do hořáku se dostává pouze jeho jemná frakce. V „plamenu“ plazmy dochází k předávání energie do vzorku, což má za následek řadu procesů – vysoušení kapek aerosolu, rozbití chemických vazeb,

excitaci atomů, ionizaci (i vícenásobnou), excitaci iontů. Následně (v chladnější části plazmy) dochází k deexcitaci excitovaných atomů a iontů a také k rekombinaci iontů. V průběhu deexcitace excitovaných atomů a iontů je přebytečná energie vyzařena ve formě elektromagnetického záření. Záření je vedeno na monochromátor. Zde je rozloženo na optických členech (hranol a mřížka) a následně po průchodu přes fotonásobič detekováno na detektoru, zpravidla na bázi CCD prvku. [69]

- **ICP MS:** Způsob vnášení vzorku do plazmy a uspořádání plazmového hořáku je v tomto případě obdobné jako u ICP-OES. Technika hmotnostní spektrometrie však nevyužívá elektromagnetické záření emitované vzorkem v plazmě, ale plazma je přímo nasávána pomocí speciálních kónusů do prostoru s vysokým stupněm vakua (pod 10 Pa). Zde pomocí iontové optiky dojde k oddělení fotonů a nenabitých částic od iontů. Tyto ionty jsou dále vedeny do kvadrupólu, kde je vybrán iont analyzovaného prvku na základě poměru hmotnosti a náboje. Vybrané ionty jsou detekovány po dopadu na fotonásobič. Technika ICP-MS umožňuje stanovení i některých prvků, které pomocí ICP-OES nejdou stanovit vůbec nebo jen velmi obtížně, např. síra nebo fosfor (z důvodů čar v příliš vzdálené UV oblasti). [69]

3.7.1.2 Energiově disperzní spektroskopie EDS

Výsledkem energiově disperzní spektroskopie je spektrum frekvencí signálů v rentgenových energetických oknech, které obsahují charakteristické píky, které korespondují s jednotlivými elementy (jejich výška odpovídá koncentraci daného prvku ve vzorku). Spektroskopie byla provedena na přístroji 1) X-MAX 50 (silikonový detektor, SDD) Oxford Instruments, který je kontrolován systémem INCA. 2) součást SEM mikroskopu Carl Zeiss ULTRA Plus, který obsahuje systém pro mikroanalýzu od firmy Oxford Instruments X-MAX 25, který je kontrolován systémem Aztec.

3.7.2 Měření struktury

3.7.2.1 Skenovací elektronová mikroskopie SEM

K analýzám skenovací elektronové mikroskopie byl použit mikroskop s vysokým rozlišením emisního pole UHR FEG-SEM Carl Zeiss ULTRA Plus (detektory SE2, InLens SE, ASB+ESB). Jedná se o mikroskop s katodou Cold FEG, tyto mikroskopy disponují nejlepší rozlišovací schopností, kvůli nižší stabilitě elektronového svazku však nejsou příliš vhodné pro analytické účely (EBSD, WDX). U tohoto typu katody dochází ke studené emisi elektronů. [70]

- **Princip:** Elektronové mikroskopy jsou také „optické“ zobrazovací zařízení, ale namísto světelného záření používají elektrickým polem urychlený svazek elektronů. Tyto elektrony procházejí přes soustavu elektromagnetických čoček. Aby nedocházelo k ovlivňování elektronů atmosférou, je celý systém, včetně vzorku, umístěn ve vakuu.

Srdcem skenovacího elektronového mikroskopu je elektronové dělo, respektive elektronová tryska. V tomto zařízení vznikají primární elektrony. Elektronové dělo je v základu tvořeno katodou. Ze záporně nabitě katody jsou elektrony emitovány směrem ke kladně nabitě anodě (díky kladnému rozdílu potenciálu dodává katoda elektronům kinetickou energii). Elektrony, které mají správný směr, jsou urychleny na dostatečnou rychlost, aby proletěli dále do tubusu. [70]

V tubusu elektrony prolétají skrz elektromagnetické cívky (solenoidy), jejichž účelem je fokusovat elektronový svazek do roviny preparátu. Elektromagnetické pole, vzniklé průchodem proudu vynutím cívky, ovlivňuje dráhu elektronů. [70]

Aby svazek nedopadal pouze do jednoho bodu preparátu, je nutné s ním pohybovat (rastrovat) a o to zajišťují skenovací cívky. Celý systém jsou evakuovány na nízký tlak ($10^{-3} - 10^{-5}$ Pa), aby nedocházelo k nežádoucím interakcím mezi elektrony a molekulami plynu.

Primární svazek elektronů dopadá na zkoumaný vzorek a postupně bod po bodu pro skenuje celou plochu. [70]

Interakce primárního elektronového svazku se vzorkem vyvolá několik fyzikálních signálů. Vybraný signál můžeme zachytit příslušným detektorem. Každý detektor nám o vzorku říká jinou informaci, například SE (Secondary Electron) ukazuje topografický kontrast naproti tomu BSE (Back Scattered Electron) ukazuje chemický kontrast. [70]

3.7.2.2 E-SEM

Pro enviromentální SEM analýzu nebyla využita žádná speciální úprava vzorků (lyofilizace, dehydratace alkoholovou řadou) z důvodu možnosti úpravy struktury či vlastností testovaných vzorků.

Samotné testování vzorků proběhlo pomocí skenovacího elektronového mikroskopu FEI QUANTA FEG 250, měření bylo provozováno v E-SEM módu s použitím SE detektoru (LFD, GSED). Vzorky byly předchlazeny na teplotu -5 až -7 °C. Tlak v komoře byl nastaven na 100 Pa. Ovládání mikroskopu a zpracování

snímků bylo uskutečněno pomocí softwaru xT microscope control v6.2.4. build 3069-supervisor.

Testované vzorky o rozměru 1·1 cm byly ponořeny do růstového média s buňkami fibroblastů (2 ml), poté byly ponechány v inkubátoru po dobu 48 hodin.

3.7.2.3 Mikroskopie atomárních sil AFM

Mikroskopie atomárních sil, která se využívá k reálnému nasnímání topografie povrchu s možností 3D zobrazení. Mikroskop rastrující sondy pracuje na úplně odlišném principu než světelné mikroskopy a skenovací elektronové mikroskopy. Jak již vlastní název napovídá, je povrch zkoumaného vzorku snímán pomocí sondy. Tato sonda se pohybuje v těsné blízkosti (řádově 100 nm) nad povrchem, kde působí meziatomární síly. Ke snímání povrchu dochází postupně po řádcích. Výsledný snímek je složen právě z těchto řádků. Díky tomu, že se sonda pohybuje v takovéto blízkosti povrchu, lze dosáhnout velmi velkého rozlišení a to tzv. subatomárního rozlišení. Analýzy provedeny na přístroji JPK NanoWizard III. [71]

- **Princip:** Velmi ostrý hrot se pohybuje nad vzorkem a je odpuzován či přitahován vzorkem. Speciální hroty, tzv. cantilevery jsou nejčastěji vyrobeny z křemíku, respektive diamantu. Zaoblení hrotu se pohybuje kolem 10 nm, při použití tzv. supersharp cantileveru se zaoblení těchto hrotů pohybuje v řádu několika atomů (nejčastěji 4 atomy). Mikroskopie atomárních sil skenuje ve dvou základních režimech, a to v kontaktním a bezkontaktním módu. Někteří výrobci podporují navíc tzv. intermittent contact. Tento režim je dán jednak typem, respektive tuhostí a délkou raménka na cantileveru, a jednak vzdáleností hrotu od zkoumaného vzorku. [71]

Při skenování v kontaktním režimu se cantilever pohybuje blíže k povrchu vzorku, než je tomu u bezkontaktního režimu, a působí na něho odpudivé Van der Waalsovy síly (v bezkontaktním režimu na hrot působí přitažlivé Van der Waalsovy síly). [71]

3.7.2.4 Transmisní elektronová mikroskopie TEM

Transmisní elektronová mikroskopie byla provedena na přístroji JEOL 1011 vybaveném CCD kamerou Veleta (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH). Tato metoda umožňuje pozorování vzorků tloušťky v řádu 100 nm při vysokém zvětšení (až asi 10^6) a rozlišení (v řádu několika desetin nm). TEM je obdobou světelného mikroskopu. Světelný zdroj optického mikroskopu je zde nahrazen zdrojem elektronů

(elektronovým dělem: stovky kV), skleněné čočky jsou nahrazeny čočkami elektromagnetickými a místo okuláru je zde fluorescenční stínítko. Celá dráha elektronů od elektronového děla až po stínítko musí být ve vakuu. Vakuum je zde nutné hned z několika důvodů. Prvním z nich je, že ve vzduchu by elektron byl absorbován. Druhým, neméně důležitým důvodem, jsou molekuly obsažené ve vzduchu. Ty by způsobily kontaminaci tubusu a vzorku. Výsledný obraz je pak pozorován přes okno v projekční komoře (na fluorescenčním stínítku). [72]

3.7.3 Testování stupně zesílení

3.7.3.1 Měření absorpce a rozpustnosti

Testování probíhalo namáčením vzorků v Petriho miskách s destilovanou vodou. Zaznamenávány byly váhové změny vzorků. Z naměřených hodnot byly vypočteny Absorpce a rozpustnost. Experiment byl realizován za běžných teplotních i vlhkostních laboratorních podmínek.

$$\% \text{ Rozpustnost} = (M_2 - M_1) / M_2 \cdot 100 \quad (12)$$

$$\% \text{ Absorpce} = (M_3 - M_2) / M_2 \cdot 100 \quad (13)$$

kde: M_1 - hmotnost po namočení a sušení, M_2 - hmotnost vzduchsuchého vzorku
 M_3 - hmotnost po namočení

Při návrhu kinetických modelů aproximujících bobtnání a rozpustnost CMC byly použity jednoduché exponenciální vztahy používané např. v popisu kinetiky barvícího procesu.

$$1) \quad M_v(t) / M_p = (M_v \infty / M_p) \cdot (1 - e^{-kt}) \quad (14)$$

$$2) \quad M_v(t) / M_p = (M_v \infty / M_p) \cdot (\sqrt{1 - e^{-kt}}) \quad (15)$$

kde: M_v - hmotnost vody, M_p - hmotnost polymeru
 k - rychlostní konstanta, t - čas

Druhý model vychází dle hodnocení pomocí metody nejmenších čtverců lépe. Z toho důvodu jsou data absorpce a rozpustnosti aproximována právě tímto modelem.

3.7.3.2 Testování stupně zesílení dle normy ČSN EN ISO 10147

Jedná se o normu – Trubky a tvarovky ze síťovaného polyethylenu (PE-X). Posouzení stupně zesíťování stanovením obsahu gelu. Tato norma byla v rámci práce použita z důvodu nedostatku norem či návodů pro stanovení obsahu gelu (rozpustnosti)

polymerních materiálů. Parametry dané normy byly upraveny pro potřeby hodnocení vzorků z CMC. Testování probíhalo ve fyziologickém roztoku. K testování vzorků byl použit přístroj s termostatickou lázní, která byla nastavena na teplotu 37 ± 2 °C.

3.7.4 Testování antibakteriálních vlastností

3.7.4.1 AATCC Test Method: 100–2004

Touto metodou (Antibacterial activity Assessment of Textile materials) je hodnocen faktor redukce, který udává, o kolik procent došlo ke snížení inokulované koncentrace bakterií. Počítá se počet obnovených bakteriálních kolonií – vždy vzhledem k neupravenému standardu. Kvalitativní hodnocení.

3.7.4.2 AATCC Method 147–2004

Jedná se o metodu orientační (An American Standard 1993), u které se hodnotí velikost tzv. halo zóny, tedy oblasti okolo testovaného vzorku. Bakteriální inokulum je očkováno na krevní agar. Kvantitativní hodnocení.

– Testované kmeny (pro obě AATCC metody): *E. coli* (CCM 2024) a *Staphylococcus aureus* (CCM 299) – dle ALE-G18, ČSNL.

3.7.4.3 Test viability na základě neporušenosti plazmatické membrány

Tyto testy jsou založeny na schopnosti neporušené plazmatické membrány nepropouštět určitá barviva do nitra buňky. V případě poškození plazmatické membrány se tato barviva navážou na vnitřní strukturu buňky a dojde k zesílení fluorescence. Tvorba bakteriálního biofilmu probíhala v médiu pro růst bakterií (Lysogeny Broth medium - 1 % Peptone G, 1 % Yeast extract, 0,5 % NaCl). Použitá barviva: Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit.

- *Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit* je vhodná a snadno použitelná souprava pro monitorování životaschopnosti bakteriální populace v závislosti na integritě membrány buňky. Buňky s narušenou membránou, které jsou považovány za mrtvé nebo umírající se zbarví červeně, zatímco buňky s neporušenou membránou se zbarví zeleně. Obsahuje barviva Syto 9 a propidium iodide.

Kit obsahuje: SYTO 9: 1,67 mM / Propidium iodide 1,67 mM (komponenta A), 300 µl roztoku v DMSO

SYTO 9 dye: 1,67 mM / Propidium iodide, 18,3 mM (komponenta B), 300 µl roztoku v DMSO

Syto 9 - volně proniká do všech buněk a po vazbě na NK emituje fluorescenci v zelené oblasti spektra. Barviva se dávkují v poměru 1:1 (komponenta A/komponenta B). 3 µl barviv/1ml bakterií.

- Médium pro růst bakterií

Lysogeny Broth medium (LB):

1 % Peptone G, 1 % Yeast extract, 0,5 % NaCl

- *Peptone G* - Pancreatic Digest of Gelatin, je enzymaticky štěpená želatina pro použití při přípravě mikrobiologických kultivačních médií. Je zdroj dusíku, aminokyselin, vitamínů a uhlíku k zajištění konzistentního růstu v mikrobiologických kultivačních médiích.

Chemické složení: Celkový dusík: min. 15,5 %
Amino dusík: min. 2,5 %
popel: ≤ 6,5 %
vlhkost: ≤ 6,0 %
pH (2 % roztok): $6,8 \pm 0,5$

- *Yeast extract* – extrakt z kvasnic, ve formě sušeného drožd'ového autolyzátu. Vzniká zpracováním kvasnicových výrobků extrakcí obsahu buněk (odstranění buněčné stěny). Je zdrojem dusíku a vitamínů.

Chemické složení: Celkový dusík: min. 11,5 %
Amino Nitrogen: min. 6,1 %
pH (2 % roztok): $7,0 \pm 0,2$

- *NaCl* – chlorid sodný min. 99,5 %

Jednotlivé komponenty se navázily a zalily částí vody, pomocí magnetického míchadla se roztok dobře promísil. Dobře rozmíchaný roztok se poté zalil zbytkem vody. 200 ml roztoku se přelilo do Erlenmeyerovy baňky. Baňka s roztokem se poté zašpuntovala pomocí bavlněné vaty a překryla alobalem. Takto připravené baňky s médii se poté umístily do laboratorního autoklávu, kde se ponechaly při teplotě 126 °C sterilizovat cca 35 minut. Média se nechaly následně vychladnout a uložily se do temné, chlazené místnosti. Před použitím byly baňky umístěny do inkubátoru na cca 30 minut.

3.7.4.4 Test biocidity/biodegradability

Respirační aktivita bakterií byla měřena na přístroji Micro-Oxymax Respirometer-Columbus Instruments International. K testování metabolické aktivity bakteriální populace bylo využito respirometrické metody (hodnocení O₂, CO₂, CH₄). Vzorky byly připraveny v souladu s normou ČSN EN ISO 9408.

– Testovaný kmen *E. coli*. Počáteční absorbance 0,076 (600 nm) ~ cca. 0,5 McFarland ($1,5 \cdot 10^8$ CFU·ml⁻¹). Přidáno 0,243 g·l⁻¹ glukózy, provedeno v BSM (minerální médium).

3.7.4.4.1 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je velmi cenným nástrojem pro studium buněk a buněčných částí mikroorganismů. Fluorescenční mikroskopy využívají schopnost některých látek absorbovat světlo o určité vlnové délce a toto světlo následně emitovat jako viditelné světlo o delší vlnové délce. Většinou se využívá dlouhovlnného ultrafialového záření a přilehlé oblasti viditelného spektra emitovaného halogenovými lampami. Ultrafialovému světlu musí být přizpůsobena optika kondenzoru, zbytek optického systému je stejný jako u běžného optického mikroskopu. Jeho odlišností je pouze doplnění o velice silný zdroj světla a dva typy filtrů. První sada filtrů je umístěna mezi zdroj světla a vzorek (umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory světlem o vybraných vlnových délkách), druhá pak vpouští do objektivu světlo, které bylo emitováno příslušným fluoroforem (bariérový chránící lidský zrak před zbytkovým UV zářením). [74]

Použitím vhodných fluoroforů je možné rozlišit jednotlivé buněčné prvky a také rozlišit živé a mrtvé buňky. Fluorofory jsou látky, jejichž podstatou je absorpce světla určité vlnové délky a následná schopnost emitovat světlo o delší vlnové délce. Můžeme je rozdělit do dvou základních tříd, na vnitřní fluorofory schopné vlastní fluorescence, které se v přírodě vyskytují přirozeně a na vnější fluorofory, které jsou přidávány ke vzorkům. [74]

Fluorescence je typickou vlastností pro fluorescenční barviva nebo fluorofory (ethidium bromide, propidium iodide), které obsahují aromatické uhlovodíky nebo heterocykly. Excitace a emise hrají důležitou roli u fluorescenčních barviv, pro každé barvivo je charakteristické určité excitační a emisní spektrum. [74]

Obecnou komplikací fluorescenční mikroskopie je to, že fluorofory jsou intenzivním zářením rozkládány a ztrácejí schopnost absorpce a emise – tzv. fotobleaching. Při absorpcích a následných emisích navíc dochází k uvolňování volných radikálů, které mohou poškozovat fluorofory, způsobovat tak fotobleaching a v neposlední řadě negativně ovlivňují životaschopnost buněk. Při práci se živými buňkami je proto zásadní (zvláště pro dlouhodobá pozorování) omezit jejich expozici světelným zářením z vysokoenergetických zdrojů. Toho je možné dosáhnout využitím clon vpouštějících do objektu excitační světlo pouze při expozici a co nejcitlivějších kamer nebo fotonásobičů. Standardní součástí fluorescenční mikroskopie je využití softwaru pro obrazovou analýzu, který umožňuje zpracovávat obrazový výstup kvantitativním i kvalitativním způsobem. [74] [75] [76]

3.7.5 Testování toxicity

3.7.5.1 Příprava buněk

Buňky používané pro testování byly buňky lidských kožních fibroblastů. Tyto buňky byly zvoleny s ohledem na předpokládanou aplikaci materiálů při hojení ran.

3.7.5.1.1 Fibroblasty

Fibroblasty, štíhlé větvenovité buňky s uniformními jádry a jemným chromatinem jsou jednou z hlavních složek buněčného tkáňového mikroprostředí, přičemž jejich základní funkcí je udržení tkáňové homeostázy a celistvosti zdravých tkání. Fibroblasty se významně uplatňují v procesech tkáňové reparace. Fibroblasty se významně podílejí na procesech hojení, kdy jsou hlavním mediátorem vzniku fibrózy a jizvení tkáně. Do okolí produkuje extracelulární matrix, tedy mezibuněčnou hmotu a různá vlákna jako například kolagen. Délka buněk roste s dobou kultivace (3 hod. – 50 μm , 48 hod. – 150 μm). [77] [78]

Pro testování byly použity 1) primární kožní fibroblasty dospělého člověka (ATCC[®] PCS-201-012[™]), které jsou bipolární a refraktilní a 2) myší fibroblasty 3T3 fibroblasty (ATCC, pasáž 7).

3.7.5.1.2 *Růstové médium*

Pro tvorbu růstového média byl použit Fibroblast Growth Kit-Low (ATCC® PCS-201-041). Do láhve s Fibroblast Basal Medium (ATCC® PCS-201-030: 480 ml) bylo přidáno:

Tab. 1: *Komponenty pro růstové médium*

Komponenta	Objem [ml]	Výsledná koncentrace
rh FGF b	0,50	5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
L-glutamine	18,75	7,5 mM
Kyselina askorbová	0,50	50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Hemisukcinát hydrokortizonu	0,50	1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
rh Insulin	0,50	5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Fetal Bovine Serum	10,00	2 %

3.7.5.1.3 *Kultivace a pasážování buněk*

Kultivace buněk fibroblastů probíhalo v kultivačních nádobách s růstovým médiem v inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C, relativní vlhkost 90 %).

Z kultivační nádoby s médiem a buňkami bylo pomocí odsávačky vysáto médium. Kultivační nádoba byla 2x propláchnuta 5 ml PBS (Phosphate Buffred Saline). Do kultivační nádoby se přidal trypsin a nádoba se umístila na 5 minut do inkubátoru. Po vyjmutí nádoby z inkubátoru bylo nutné nádobou kývat, aby se buňky fibroblastů dobře odlepily ode dna nádoby. Do kultivační nádoby s trypsinem se přidalo 6 ml růstového média. 2 ml takto připravené buněčné suspenze se přeneslo do nové kultivační nádoby, ve které již bylo předem doplněno růstové médium (13 ml). Nádoba s přepasážívanými buňkami byla umístěna do inkubátoru.

Pasážování buněk bylo vhodné provádět 1 – 2x týdně. Fibroblasty se mohou pasážovat až 16x. Pasážováním buněk se zajistí zásobování buněk proteiny, růstovými faktory a adhezními bílkoviny. Buňky se dají dále testovat po 3 – 4 pasážích.

3.7.5.1.4 *Počítání buněk pro účely určení koncentrace buněk*

Přesné stanovení počtu buněk ve vzorku je v biologických a medicínských oborech pro řadu postupů nezbytné. Pro určení koncentrace buněk v suspenzi se využívají dva základní přístupy. První využívá speciálních počítacích komůrek ve spojení se světelnou mikroskopií, druhý přístup využívá automatizovaného počítání za pomoci speciálních přístrojů. V rámci těchto experimentů byla využívána metoda

první. Bürkerova počítací komůrka je tvořena silným podložním sklem se dvěma vyrytými počítacími sítěmi s přesně danou plochou a hloubkou. Počítací síť Bürkerovy komůrky je tvořena 9 velkými čtverci (každý o ploše 1 mm²), které jsou dále rozděleny do 16 menších čtverců (jejich plocha je 0,04 mm²).

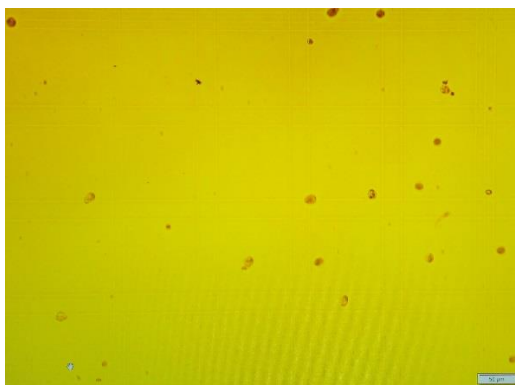
Při počítání buněk pomocí počítací komůrky byl nejprve nanesen malý objem (10 µl) testované buněčné suspenze mezi krycí a podložní sklo. Takto připravená počítací komůrka se vložila do zorného pole světelného mikroskopu a po zaostření se přistoupilo k samotnému počítání částic. Při počítání buněk pomocí počítacích komůrek se započítávají pouze ty, které se nacházejí uvnitř čtverce (čtverce jsou odděleny trojitou čarou) a buňky, které se z vnitřní nebo vnější strany dotýkají dvou stanovených stran (horní a levá). Tím se zabrání dvojímu počítání částic.

- Př. průměr napočítaných buněk je 37, což znamená, že v 1 ml buněčné suspenze je 370 000 buněk. Požadovaná koncentrace buněk je 30 000·ml⁻¹. Máme 5 vzorků, na které chceme vysévat buňky – potřebujeme 10 ml růstového média s buňkami (výpočet viz rovnice 16 a 17).

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2 \quad (16)$$

$$370\,000 \cdot V1 = 30\,000 \cdot 10 \quad (17)$$

- $V1 = 1,7$ ml buněčné suspenze + 8,3 ml média



Obr. 11: Ukázka počítání buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu

3.7.5.2 Stanovení viability buněk - XTT

XTT metoda se používá pro stanovení viability buněk. Solubilní sloučenina XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) je v živých buňkách redukována na ve vodě rozpustný oranžový formazan. Stupeň zabarvení roztoku získaného redukcí XTT je přímo úměrný počtu živých buněk ve vzorku. Absorbance při spektrofotometrickém stanovení se měří při vlnové délce 475 nm.

3.7.5.2.1 Příprava extraktů

Extrakty byly připraveny dle normy PN-EN ISO 10993-12. Sterilní vzorky o definované velikosti byly ponořeny do 3 ml média. Takto připravené roztoky se vzorky byly umístěny do inkubátoru, kde byly ponechány po dobu 24 hodin. Po uplynutí časového intervalu byly vzorky z roztoku vyjmuty.

Tab. 2: Vhodné extrakční poměry testovaných materiálů s různou tloušťkou dle ISO 10993-12

Tloušťka (mm)	Extrakční poměr $\pm 10\%$	Materiál
$\leq 0,5$	$6 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$	Kov, syntetický polymer, keramika, kompozitní filmy
$> 0,5$	$3 \text{ cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$	Kov, syntetický polymer, keramika, kompozitní filmy, desky, lisované vzorky

3.7.5.2.2 Test

Médium s buňkami o koncentraci 10^6 se po počítání rozdělí do malých 15 ml falkon. Falkony se dají následně centrifugovat (3000, 5 min.). Poté se z falkon odsálo médium a přidaly se extrakty vzorků (1,2 ml). Z každé falkony bylo následně pomocí mikropipety odebráno $12 \cdot 100 \mu\text{l}$ (do 12-ti jamek). Experimenty byly provedeny s použitím 96-ti jamkových E-destiček. Do řady B až G byly přidány extrakty s buňkami. Takto připravené destičky se nechaly inkubovat po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby inkubace se z jamek odsál extrakt a jednotlivé jamky se 2x promyly puftrem. Poté se do každé jamky aplikovalo $50 \mu\text{l}$ reakčního XTT kitu a destičky se opět vrátily do inkubátoru na dobu 2 – 4 hodiny.

Specifická absorbance se poté vypočítala $= A_{475}(\text{test}) - A_{475}(\text{blank}) - A_{660}(\text{test})$

3.7.5.2.2.1 Reakční kit

Do 5 ml XTT reaktantu se přidalo 0,1 ml aktivátoru.

- XTT = (sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium) – inertní sůl

- Aktivátor (PMS) = (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) – funguje jako přechodový přenašeč elektronů. PMS pomáhá řídit redukci XTT a formuje derivát formazanu.

3.7.5.3 Live/dead (Testy viability využívající aktivity esteráz)

Live/Dead test zkoumá životnost buněk. Ta se dá měřit pomocí vitálních barviv. Použitými vitálními barvivy v tomto experimentu byly Calcein AM ($C_{46}H_{46}N_2O_{23}$) pro živé buňky (zelená fluorescence indikuje intracelulární esterázovou aktivitu) a Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}BrN_3$) pro buňky mrtvé (červená fluorescence indikuje ztrátu integrity plasmatické membrány).

3.7.5.4 Testování adheze a proliferace buněk

3.7.5.4.1 MTT

Je kolorimetrický test, který měří metabolickou aktivitu buněk a je vhodný pro analyzování jejich proliferace, viability a cytotoxicity materiálu. Je založen na redukci žluté solubilní tetrazoliové soli MTT (3-(4, -dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolium bromid) na nerozpustný formazan, který je ve formě fialových krystalků. Reakce probíhá na mitochondriální membráně vlivem mitochondriálních dehydrogenáz živých buněk. Počet živých buněk je tedy indikován množstvím redukovaného MTT. Formazanové krystalky se následně rozpustí přidáním okyseleného izopropanolu a spektrofotometricky se stanoví hodnota absorpance roztoku.

3.7.6 Termoizolační vlastnosti

3.7.6.1 Měření tepelné vodivosti (λ), tepelné jímavosti (b) a tepelného odporu (r)

Měření bylo provedeno na přístroji ALAMBETA s tlakem 200 Pa. Měření tepelných vlastností na přístroji ALAMBETA spočívá v průchodu tepelných toků $q_1(t)$ a $q_2(t)$ povrchy vzorku od neustáleného stavu k ustálenému (t_1 je teplota měřící hlavice, t_2 je teplota vzorku, základny přístroje). Přístroj ALAMBETA je počítačem řízený poloautomat, který vypočítá všechny statistické parametry měření a obsahuje autodiagnostický program, který zabraňuje chybným operacím přístroje.

- **Tepelná vodivost:** Součinitel měrné tepelné vodivosti λ představuje množství tepla, které proteče jednotkou délky za jednotku času a vytvoří rozdíl teplot 1 K. S rostoucí teplotou, teplotní vodivost klesá, výsledná hodnota se dělí 10^3 . Materiály, které mají vysokou hodnotu λ se označují jako vodiče, materiály s nízkou hodnotou λ jako izolátory.
- **Tepelná jímavost b** je jediný parametr, který charakterizuje tepelný omak a představuje množství tepla, které proteče při rozdílu teplot 1 K jednotkou plochy

za jednotku času v důsledku akumulace tepla v jednotkovém objemu. Jako chladnější pocítujeme hmatem ten materiál, který má větší tepelnou jímavost (větší b).

- **Plošný odpor vedení tepla r** je dán poměrem tloušťky materiálu a měrné tepelné vodivosti. Udává, jaký odpor klade materiál proti průchodu tepla textilií. Čím nižší je tepelná vodivost, tím vyšší je tepelný odpor. Z výše uvedeného vyplývá, že nízká tepelná vodivost a vysoký tepelný odpor charakterizují kvalitní tepelnou izolaci.

3.7.6.2 Inovativní zařízení pro měření termoizolačních vlastností

Zařízení využívá klimatizační komoru, ve které byl umístěn dutý válec, který byl zahříván na teplotu 35 °C (simulace teploty lidské pokožky). Teplota materiálu, který byl umístěn na válci, byla měřena pomocí digitálního infračerveného teploměru. Teplota v komoře byla nastavena na $-20 \pm 0,1$ °C s 80 % vlhkostí.

3.7.7 Další analýzy

3.7.7.1 FTIR

Infračervená spektroskopie je analytická technika určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a stanovení anorganických látek. Při této metodě se měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce zkoumaným materiálem. Analýzy byly provedeny na přístroji iN10 MX s vedlejším vzorkovacím prostorem iZ10 FTIR.

3.7.7.2 Testování prodyšnosti

Měření prodyšnosti byla provedena pomocí přístroje FX 3300 Air Permeability Tester III od společnosti TexTest. Celá metodika měření probíhala v souladu s normou EN/ISO 9237 (použitý tlak 100 Pa).

3.7.7.3 Výpočetní tomografie (CT)

K analýze byl použit stolní mikro-tomograf SkyScan 1272, který je schopen nedestruktivní analýzy a zobrazuje strukturu materiálů (Image Pixel Size = 1,28 μm ; Exposure = 530 ms; Source Voltage = 40 kV).

- **Princip:** Měření je založeno na absorpci rentgenového záření vzorkem s použitím mnoha projekcí a následného počítačového zpracování obrazu. Rentgenka emituje úzce kolimovaný svazek záření ve tvaru vějíře, který prochází vyšetřovaným

objektem a je registrován sadou detektorů přeměňujících prošlá kvanta rentgenového záření na elektrický signál, který je digitalizován a dále zpracováván. Komplet „rentgenka – detektory“ vykonává během expozice synchronní pohyb okolo vyšetřovaného objektu tak, že rentgenka je vždy na protilehlé straně vyšetřovaného objektu než detektory.

3.7.7.4 Změna jasu

Barevnost byla hodnocena měřením reflektance za použití spektrometru Datacolor spectraflash 600.

- **Princip:** Reflektance je poměr intenzity světla odraženého od objektu k intenzitě světla dopadajícího na objekt. Reflektance tedy vyjadřuje, jak moc objekt světlo o dané vlnové délce odráží. Když tento parametr zjistíme pro všechny vlnové délky v intervalu přibližně 380 – 750 nm, tak tím získáme reflexní spektrum charakterizující objekt.

3.7.7.5 Stanovení molekulové hmotnosti vláknenných forem CMC

Byl použit HPLC systém Ultimate 3000 firmy dionex s připojeným ELSD detektorem 385-LC firmy Varian a RALS/LALS detektorem 1260 Infinity II firmy agilent. Separace probíhala na koloně Shodex Asahipak GF 7M s délkou 300 mm a vnitřním průměrem 7,8 mm. Přístroj byl ovládán softwarem Chromeleon verze 6.80 SR12.

Byla použita mobilní fáze obsahující 200 mM mravenčan amonný 25 mM TFA a 5 % MeOH ve vodě okyselená kyselinou mravenčí na pH 4. Rychlost průtoku mobilní fáze byla $0,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Kolona byla udržována při teplotě 35 °C. Bylo nastříkováno 30 μl vzorku. Teplota nebulizéru ELSD detektoru byla nastavena na 90 °C, teplota evaporátoru na 80 °C. Průtok dusíku byl nastaven na $1,6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4 Výsledky a vyhodnocení

Část s výsledky experimentů byla rozdělena do 7 kapitol z důvodu přehlednosti dosažených výsledků.

4.1 Sítování CMC za účelem vytvoření hydrogelu s optimálními vlastnostmi

Testování sítování pomocí mrazících cyklů ukázalo, že počet mrazících cyklů, po které je vzorek střídavě vystaven chladu a teple nemá na stupeň zesítnění výrazný vliv. Bez ohledu na počet cyklů byl stupeň zesítnění spíše ovlivněn množstvím vody, která je přidána před samotným sítováním. Pro následné porovnání byl vybrán vzorek, který obsahoval 1:1 (voda/CMC) a absolvoval 3 mrazící cykly.

Výsledky sítování pomocí tepla (vzduchosuchá sušárna) poskytly optimální teplotu a čas působení tepla s ohledem na co nejvyšší poměr absorpce/rozpustnosti. Optimální teplota byla experimentálně stanovena na 180 °C po dobu 15 minut.

Během sítování pomocí BDDGE bylo testováno 10 různých koncentrací použitého sítovacího činidla (0,02 - 1,00 g/0,06 g CMC). I při této metodě se podařilo stanovit optimální hodnotu použité koncentrace sítujícího činidla a to sice 0,06 g/ 20 ml roztoku CMC s ohledem na nízkou rozpustnost takto připraveného filmu. Toto sítovací činidlo bylo dále testováno pro jeho velký potenciál ve zdravotnických aplikacích. [79]

Výsledky sítování pomocí karboxylových kyselin byly pro obě použité kyseliny téměř shodné. Z toho důvodu bude v následném porovnání použita pouze kyselina citrónová. Za optimální hodnotu hmotnosti použitého sítovacího činidla s ohledem na poměr absorpce/rozpustnosti byla stanovena hmotnost 0,015 g/ 15 ml roztoku CMC.

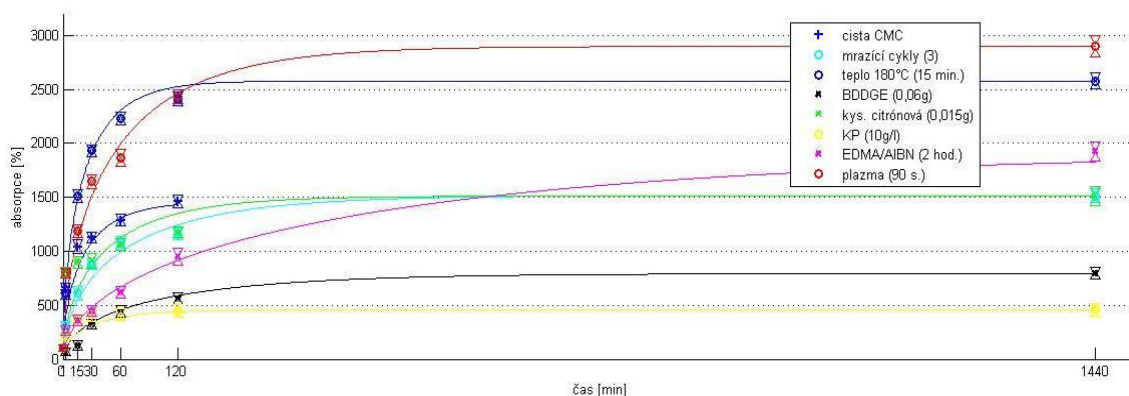
Při použití kationaktivního prostředku jako sítovacího činidla byly testovány 4 koncentrace roztoků KP, do kterých byl následně ponořen film z CMC. Jako optimální koncentrace použitého KP byla experimentálně stanovena hodnota 10 g·l⁻¹.

Z výsledků experimentů použití EDMY jako sítovacího činidla a AIBN jako reakčního činidla byla stanovena optimální doba reakce na 2 hodiny s ohledem na poměr absorpce/rozpustnosti.

Sítování pomocí gama záření neposkytlo výsledky dle očekávání (dle literatury). Maximální výše dávek ozařování byla stanovena s ohledem na dávky, které se běžně používají ke sterilizaci. Během ozařování filmů a roztoků CMC došlo k degradaci a materiály se po vložení do vody téměř ihned rozpustily. U vzorků netkaných textilií

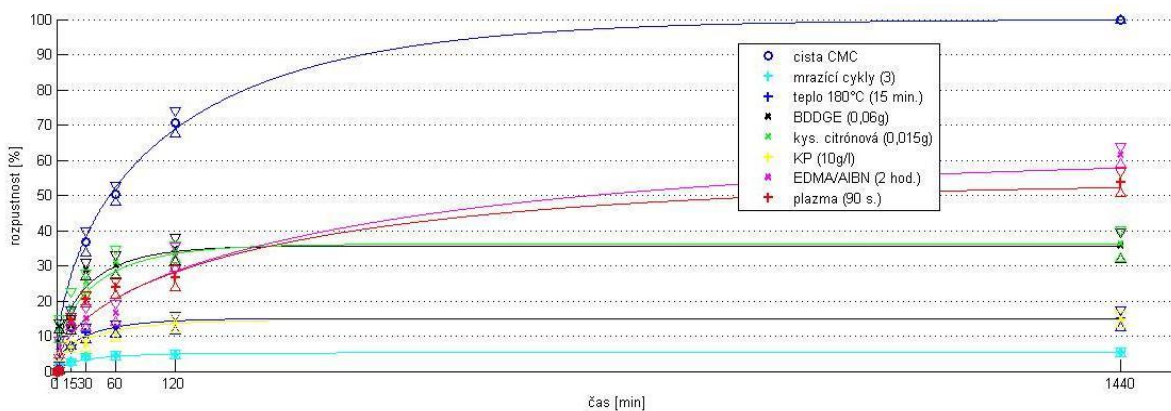
po ozařování nedošlo k žádným změnám v absorpci či rozpustnosti. Vzorky síťované s využitím radičního záření nebudou podrobeny dalšímu testování.

Během experimentů s plazmatickým síťováním vyplynulo, že vakuové plazma poskytuje účinnější síťovací efekt než plazma atmosférické. To je pravděpodobně způsobeno výkonem plazmatu a čistotou prostředí. Nejlepší hodnoty absorpce/rozpustnosti byly stanoveny při plazmování po dobu 90 sekund.



Graf 1: Absorpce CMC po síťování vybranými metodami

Neupravený vzorek CMC filmu dosáhl hodnot absorpce cca 1500 %, ale po 2 hodinách namáčení ve vodě se začal rozpouštět. K úplnému rozpuštění došlo po cca. 6 hodinách namáčení. Nejvyšších naměřených hodnot absorpce po namočení ve vodě dosáhl vzorek síťovaný plazmou (přibližně 2 násobek oproti neupravené CMC). Druhé nejvyšší absorpce dosáhl vzorek síťovaný teplem (přibližně 1,7 násobek oproti neupravené CMC). Z grafu 1 je rovněž patrné, že např. vzorek upravený kationaktivním prostředkem dokáže absorbovat přibližně 5ti násobek své původní váhy, zatímco např. vzorek upravený teplem dokáže absorbovat více než 20ti násobek své původní váhy.



Graf 2: Rozpustnost CMC po síťování vybranými metodami

V Graf 2 lze vidět, že nejnižší rozpustnosti bylo dosaženo pomocí síťování mrazíci cykly, kdy byla naměřená rozpustnost po 24 hodinách namočení ve vodě přibližně 5 %. Další metody síťování, které výrazně omezily rozpustnost CMC filmů, byly metody využívající kationaktivní prostředek a teplo (15 % po 24 hodinách namáčení).

Tab. 3: Poměr absorpce/rozpustnost \pm směrodatná odchylka

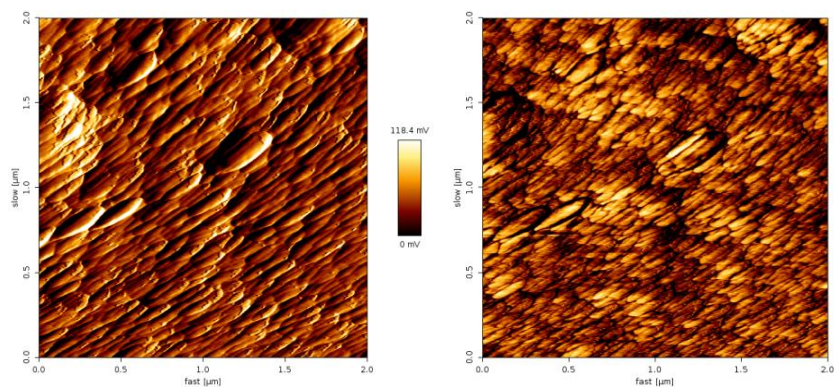
	Absorpce/Rozpustnost [%] (24 hodin)
Čistá CMC	19,7 \pm 1,7
Mrazíci cykly (3 cykly)	206,8 \pm 16,9
Teplo (180 °C, 15 min.)	129,8 \pm 8,2
BDDGE (0,06g)	16,0 \pm 0,7
Kys. Citrónová (0,015g)	39,1 \pm 2,8
KP (10 g·l ⁻¹)	38,7 \pm 0,3
EDMA/AIBN (2 hod.)	13,6 \pm 2,0
Epichlorhydrin	11,5 \pm 0,8
Plazma (90 s.)	81,4 \pm 3,3

Z Tab. 3 je zřejmé, že fyzikální metody síťování jsou z hlediska poměru absorpce/rozpustnosti nejúčinnější síťovací metody.

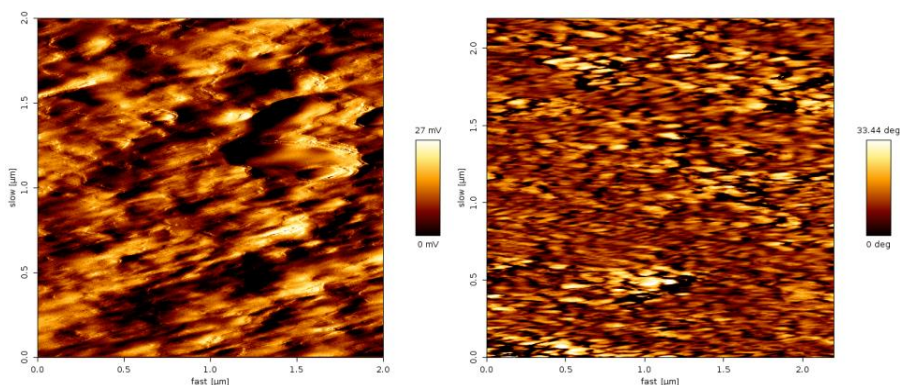
Tab. 4: Výsledky vybraných síťovadel na stupeň zesíťování dle normy ČSN EN ISO 10147

Vzorek	Obsah gelu (podíl nerozpuštěné složky) [%]
Čistá CMC	46
EDMA + AIBN (2 hod.)	51
1,4-butanediol diglycidyl ether (0,06 g)	42
Kationaktivní prostředek (10 g·l ⁻¹)	49
Kyselina citrónová (0,015 g)	42
Plazma (90 s)	78

Jako velice účinná metoda síťování se ukázala metoda s využitím plazmatu (viz Tab. 4). Z důvodu nelehké interpretace chemické reakce, která při plazmování vzorku nastala, byla pro její hydrofóbní účinek prověřena i možnost, že se na této reakci může podílet změna morfologie povrchu (viz Obr. 12 a Obr. 13).



Obr. 12: Povrchová struktura plazmovaného vzorku (a) vlevo a (b) vpravo



Obr. 13: Povrchová struktura neplazmovaného vzorku (a) vlevo a (b) vpravo

Z výše uvedených obrázků je zřejmé, že po plazmování došlo ke změně morfologie povrchu.

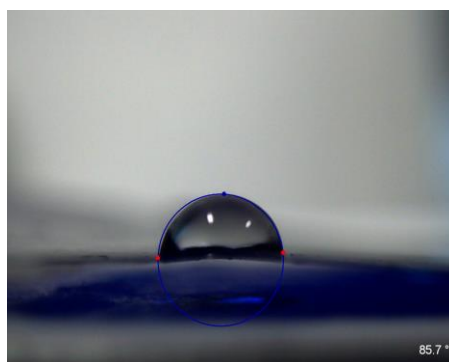
Tab. 5: Srovnání průměrných hodnot obou způsobů měření rozpustnosti

	Čistá CMC	EDMA + AIBN	Kys. citrónová	BDDGE	KP	Plazma
Rozpustnost 1 – voda [%]	49	25	26	26	10	23
Rozpustnost 2 – fyziologický roztok (ČSN EN ISO 10147) [%]	54	49	58	58	51	22

Z Tab. 6 je patrný značný rozdíl v naměřených hodnotách, což vyplývá z rozdílnosti obou použitých metod měření rozpustnosti. A také tím, že rozpustnost 1 byla testována ve vodném médiu, zatímco rozpustnost 2 ve fyziologickém roztoku.

Tab. 6: Hodnocení stupně zesílení měřením kontaktního úhlu (kapička – 3 μ l vody)

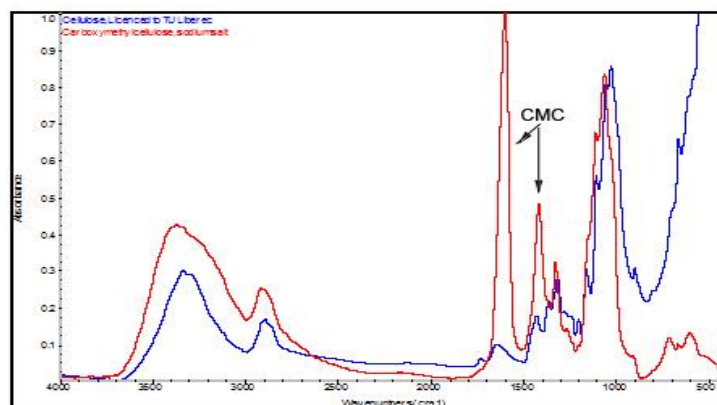
	CMC čistá	BDDGE	Kyselina citrónová	EDMA+AIBN	KP	Plazma
Kontaktní úhel [°]	67 \pm 2,1	41 \pm 2,4	66 \pm 3,2	67 \pm 2,5	52 \pm 2,5	44 \pm 1,8



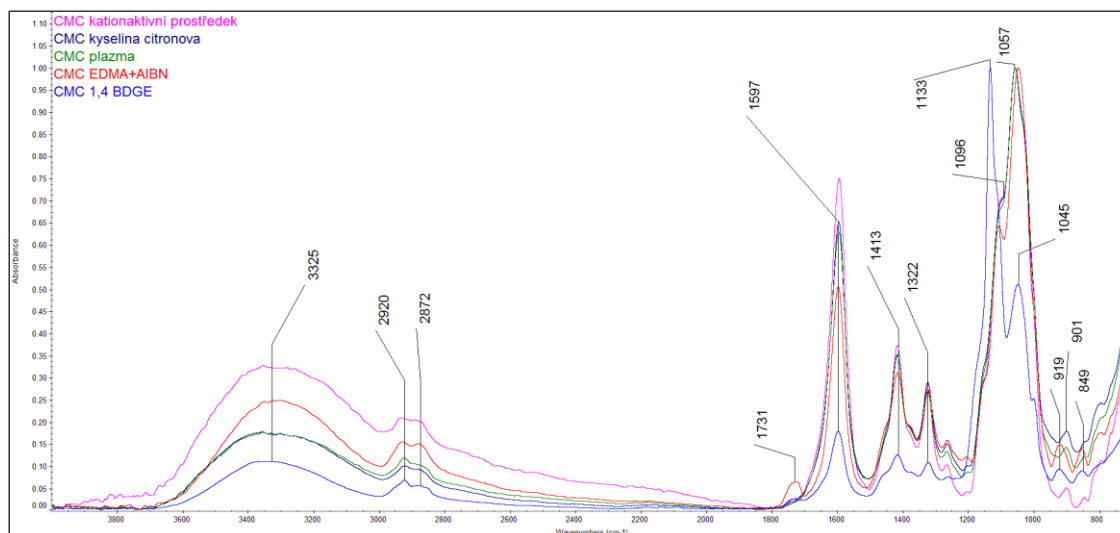
Obr. 14: Měření kontaktního úhlu za použití barviva

Z důvodu naměření velkého kontaktního úhlu (viz Tab. 6) v případě neupravené CMC, byl proveden experiment s využitím modrého barviva ke zvýraznění děje uvnitř kapky (přímé saturnové barvivo – modř LB). Z Obr. 14 je patrné, že na dně kapky po kápnutí na polymer (CMC) vzniká gel, takže plocha kapky lépe drží, tudíž je kontaktní úhel větší. Z této skutečnosti vyplývá, že menší kontaktní úhel v podstatě značí vyšší stupeň zesílení, protože se omezuje tvorba gelu v kapce.

Stupeň zesílení byl hodnocen i infračervenou spektroskopií. Pro porovnání bylo pomocí IČ změřeno spektrum celulózy a CMC viz Graf 3.



Graf 3: IČ spektrum CMC a celulózy



Graf 4: Souhrnné spektrum chemicky a radiačně upravených filmů

Z Graf 4 je patrné, že v rozmezí vlnových délek 1000 – 1200 došlo k absorpci cukrů u testovaných vzorků. V rozmezí 1200 – 1300 došlo k CH_2 a CH absorpci. Rozmezí vlnových délek 1550 – 1650 je nejdůležitějším intervalem daného spektra, avšak tento interval je těžce interpretovatelný, neboť je tato oblast zároveň otiskem palce. Výraznější rozdíl ve spektrech je patrný u vzorku s BDDGE a to tím, že došlo ke změně skeletu. Zároveň byla v tomto rozmezí naměřena nejnižší hodnota, která vykazuje vyšší stupeň zesílení. V intervalu 1500 – 1900 došlo k absorpci dvojných vazeb u měřených vzorků a v rozmezí 3900 – 2500 došlo k tzv. valenční vibraci vazeb vodíku (– OH skupiny zde velmi ochotně vytváří vodíkové můstky poskytující tak velmi široký pás). Ve spektrech jsou patrné změny v typu a celkovém množství karboxylových skupin. S ohledem na fakt, že IČ analýza poskytuje informace zejména o koncových skupinách, není výsledek zcela jednoznačný.

4.2 Testování absorpce v tlumivých roztocích

V experimentu byla testována nasákavost vzorků karboxymethylcelulózy ve třech různých roztocích, které jsou složením a poměrem elektrolytů podobné krevní plasmě. Testována byla nasákavost vzorků v časovém intervalu od 5 minut do 3 dnů. Každý vzorek byl před ponořením do roztoku zvážen, poté byl umístěn do petriho misky s 20 ml roztoku a po uplynutí doby ponoření byl opětovně zvážen. Rovněž byla ověřována rozpustnost vzorku vysušením vzorku po namočení při 105 °C do dosažení konstantní hmotnosti.

Lékopis použitých tlumivých roztoků

- ***Tlumivý roztok fyziologický o pH 7, 2***

8,0 g chloridu sodného R, 0,20 g chloridu draselného R, 0,10 g chloridu vápenatého bezvodého R, 0,1 g chloridu hořečnatého R, 3,18 g hydrogenfosforečnanu sodného R a 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného R se rozpustí ve vodě R a zředí se na 1000 ml.

- ***Tlumivý roztok fosforečnanový s chloridem sodným o pH 7, 4 (1)***

0,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného R, 6,4 g hydrogenfosforečnanu sodného R a 5,85 g chloridu sodného R se rozpustí ve vodě R a zředí se na 1000 ml.

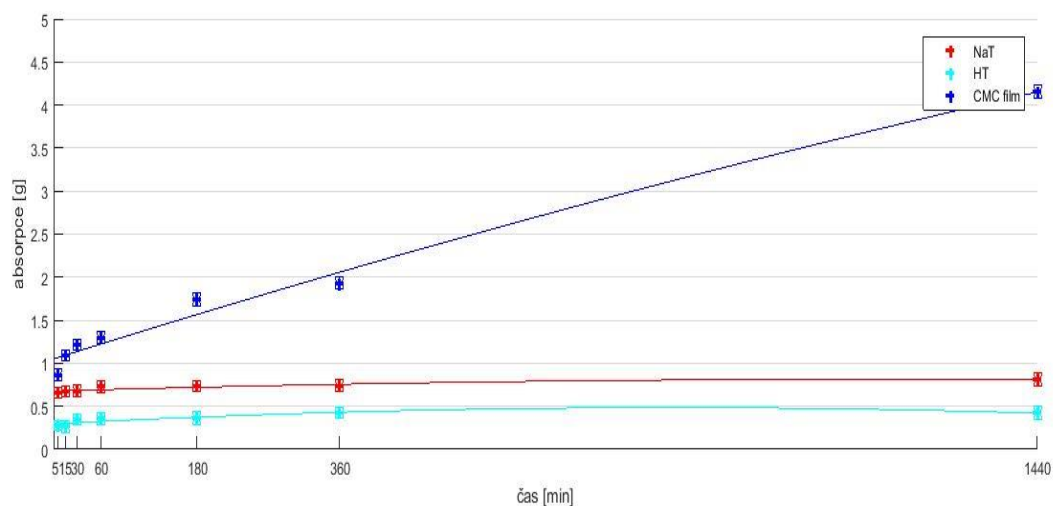
- ***Roztok A***

8,3 g chloridu sodného R, 0,28 g chloridu vápenatého R se rozpustí ve vodě R a zředí se na 1000 ml.

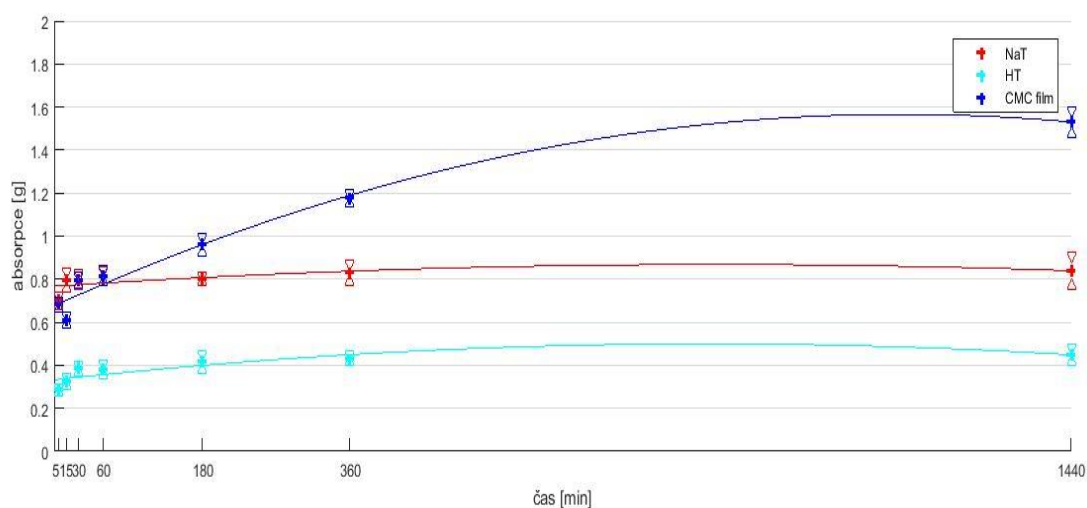
Celkem byly otestovány 3 typy materiálů s označením:

- CMCNa (MW 250 000, DS 0,7 - film připravený z roztoku karboxymethylcelulózy 30 g·l⁻¹, zesíťný při 180 °C po dobu 15 minut)
- NaT (sodná sůl CMC v textilní formě, DS 0,251, pH 6,5)
- HT (kyselá sůl CMC v textilní formě, DS 0,385, pH 4,1)

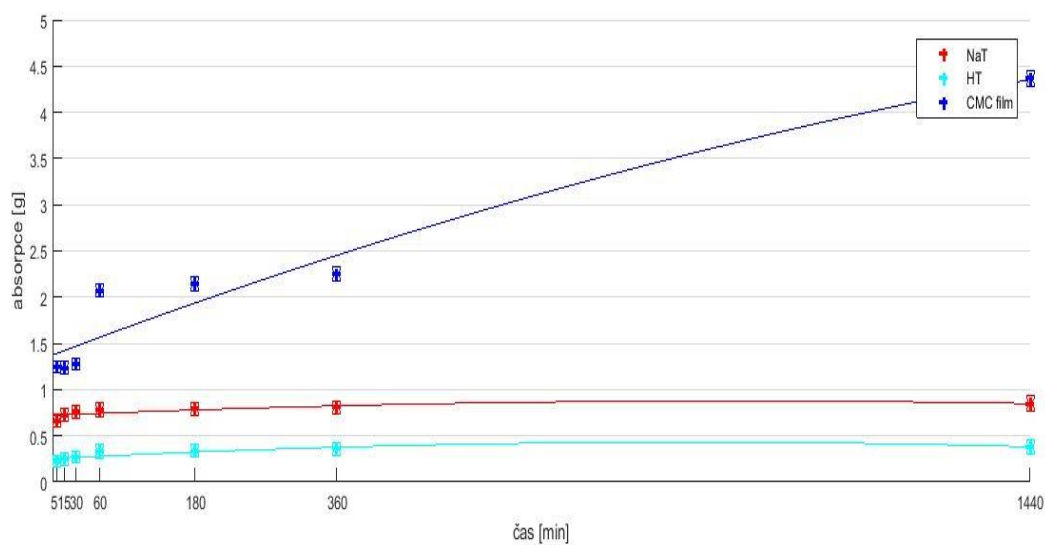
Výsledky nasákavosti (absorpce) vzorků v průběhu experimentu v jednotlivých použitých roztocích jsou znázorněny v Graf 5, Graf 6 a Graf 7.



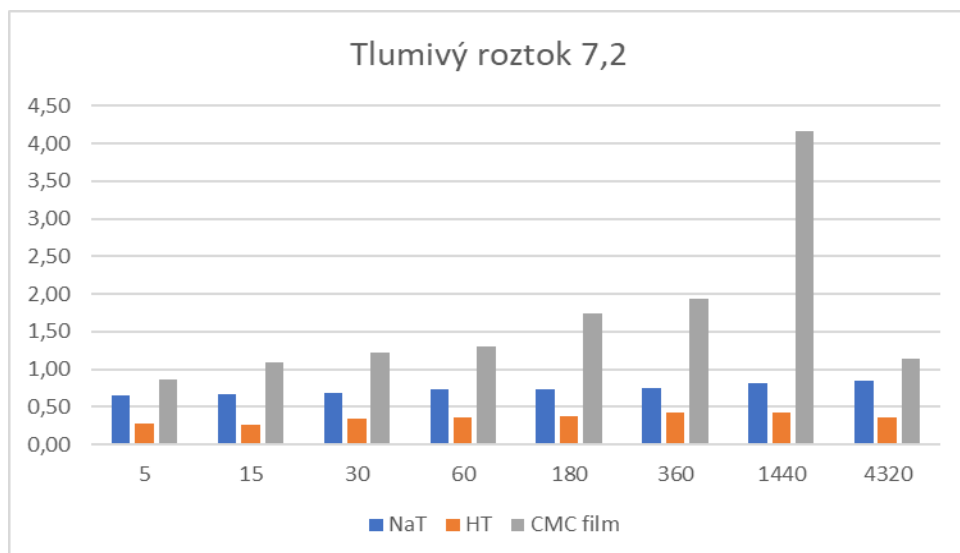
Graf 5: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,2 (hmotnostní přivažek - průběh experimentu v čase)



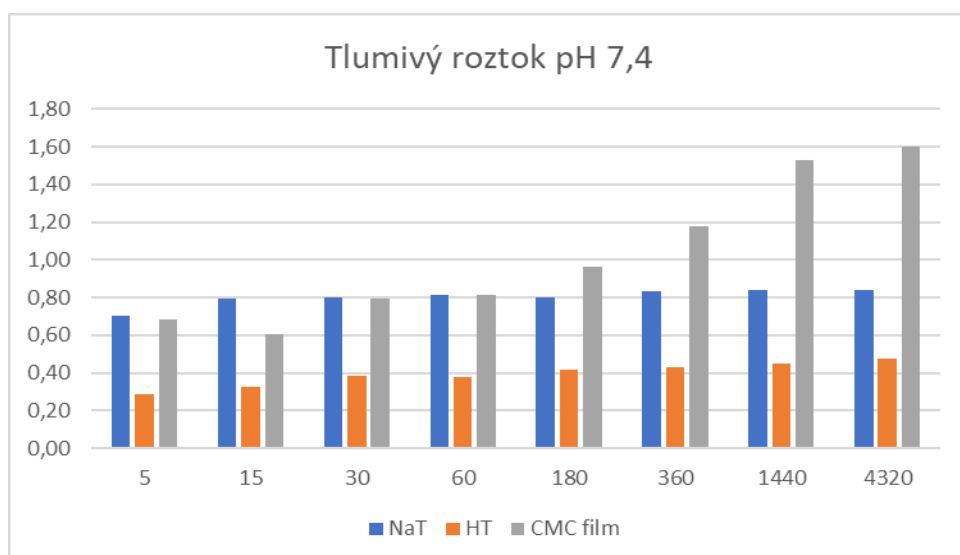
Graf 6: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,4 (hmotnostní přivažek - průběh experimentu v čase)



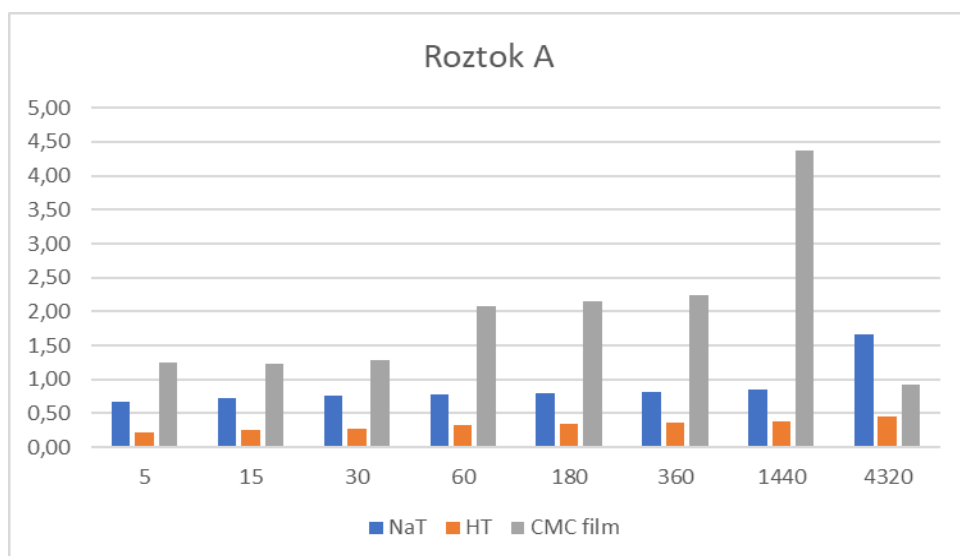
Graf 7: Absorpce vzorků CMC v roztoku A (hmotnostní přivažek - průběh experimentu v čase)



Graf 8: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,2 (hmotnostní přivažek [g])



Graf 9: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,4 (hmotnostní přivažek [g])



Graf 10: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku A (hmotnostní přivažek [g])

Shodně při použití tlumivých roztoků s různým pH nejlépe roztoky nasáká vzorek zesíťovaného CMC filmu, a to o dvojnásobně oproti vzorku NaT (viz Graf 8,

Graf 9 a Graf 10). Nejhuře tlumivé roztoky absorbuje vzorek HT. Rozpusťnost všech použitých forem CMC byla nulová. Ve všech případech byla hmotnost vzorku po namočení a vysušení vyšší než hmotnost původní, tj. na počátku experimentu.

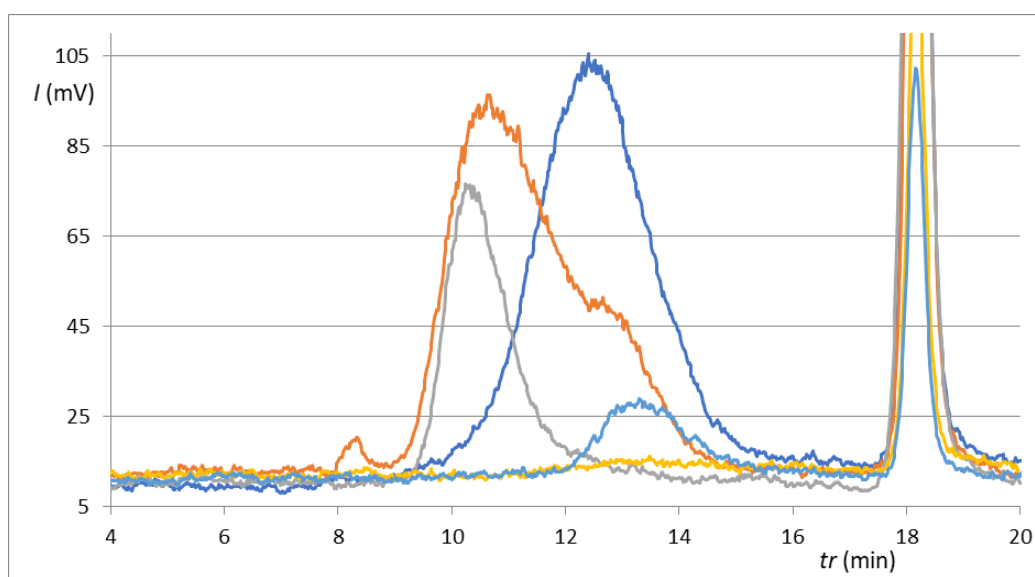
Dílčím cílem tohoto experimentu bylo rovněž provést charakterizaci vzorků CMC ve vlákně podobě (HT, NaT) viz kap. 3.1.

Pro stanovení molekulové hmotnosti karboxymethylcelulózy v poskytnutých textilních materiálech bylo odváženo 16 mg vzorků označených NaT a HT do 10 ml vialky. Ke vzorkům bylo přidáno 2 ml 6 % roztoku čpavku a byly důkladně zvortexovány. Poté bylo přidáno 4 ml mobilní fáze a roztoky byly ponechány na magnetickém míchadle nastaveném na 50 °C přes noc za stálého míchání. Poté byly vzorky okyseleny přidavkem 2 ml 1 M kyseliny mravenčí, přefiltrovány přes nylonový stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a nastříknuty. Vzorky byly poté připraveny ještě znovu s vyššími navážkami – 160 mg pro NaT a 32 mg pro HT. Po rozpuštění byly tyto vyšší navážky přefiltrovány na předváženém nylonovém membránovém filtru a zfiltrvány pomocí vakuové filtrační aparatury. Filtrát byl použit pro novou GPC analýzu a nerozpustné zbytky byly důkladně promyty destilovanou vodou vysušeny při 50 °C do konstantní hmotnosti. Navážky vzorků jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7: Navážky vzorků karboxymethylcelulózy a podíl rozpustný za zvolených podmínek

vzorek	Navážka (g)	po vysušení (g)	rozpustný podíl	rozpustný podíl
			g	%
NaT1	0,0166	-	-	-
HT1	0,0165	-	-	-
NaT2	0,1581	0,1444	0,0137	8,7
HT2	0,0317	0,0263	0,0054	17

Pomocí ELSD detektoru se podařilo zjistit, že ve vzorku HT se převážná část karboxymethylcelulózy částečně rozložila a má ještě menší molekulovou hmotnost, než komerční CMC MW 90 000 (Graf 11). Záznam z RALS/LALS detektoru bohužel není pro účely určení molekulové hmotnosti příliš použitelný, protože všechny vzorky (s výjimkou CMC MW 700 000) obsahují drobný podíl vysokomolekulárních příměsí, které v koncentracích nedetekovatelných pro ELSD detektor poskytují vysoký signál na RALS a LALS detektoru.



Graf 11: Chromatogramy vzorků CMC zaznamenané ELSD detektorem. Komerční vzorek 90 000 (modře), komerční vzorek 250 000 (červeně), komerční vzorek 700 000 (zeleně), NaT (fialově) a HT (světle modře).

Rozpustný podíl vzorku HT má MW přibližně 70 000, u vzorku NaT nelze posoudit. U obou vzorků se převážná část materiálu zesít'ovala do nerozpustné formy.

4.3 Příprava 3D mikroporézní struktury vhodné pro proliferaci buněk

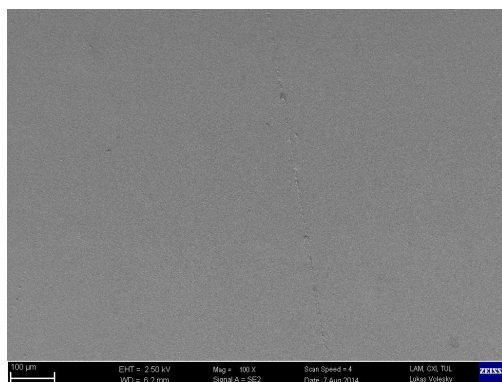
Z výsledků experimentů vyplývá, že vzorky s nižším stupněm substituce absorbují nižší množství vody před lyofilizací. Z toho důvodu je i nárůst tloušťky výsledné struktury nižší. Rovněž experimenty přinesly poznatek o tom, že výsledná 3D mikroporézní struktura je u lyofilizátů s nižším stupněm substituce více prodyšná a má horší termoizolační vlastnosti. Lyofilizace má rovněž vliv na sorpční vlastnosti materiálů, přesněji navlhavost a rozpustnost ve vodě či fyziologickém roztoku klesá přibližně o 10 %.

Příklad

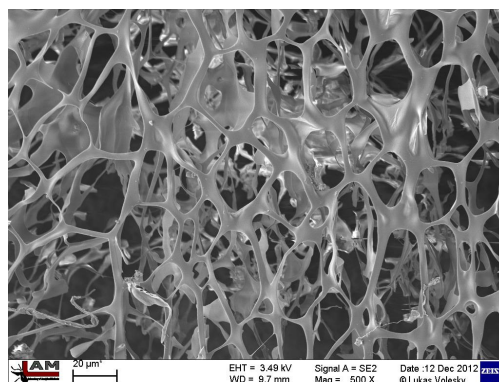
Změna vlastností je patrná na ukázce jednoho z experimentů, při kterém byla použita sodná sůl CMC v práškové a vlákenné podobě. Z práškové formy sodné soli byl připraven roztok o koncentraci $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, z kterého byl sušením připraven film. Vlákenná podoba sodné soli CMC (DS 0,345, pH 6,6) byla použita jak v podobě textilie, tak byla rovněž rozpuštěna ve vodě pro dosažení roztoku o koncentraci CMC $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, z kterého byl posléze rovněž připraven film.

- Podmínky lyofilizace:*
1. mražení – 4 hodiny
 2. vakuum – 18 hodin (1,000 mbar (100 Pa))
 3. ohřev políc – 1 hodina (0,500 mbar (50 Pa))

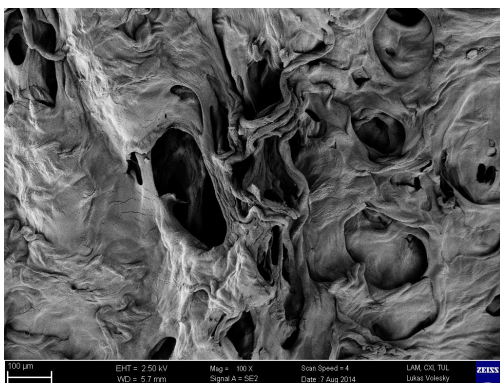
Upravená struktura vlivem lyofilizace je zobrazena na snímcích z elektronové mikroskopie viz Obr. 15 až Obr. 20.



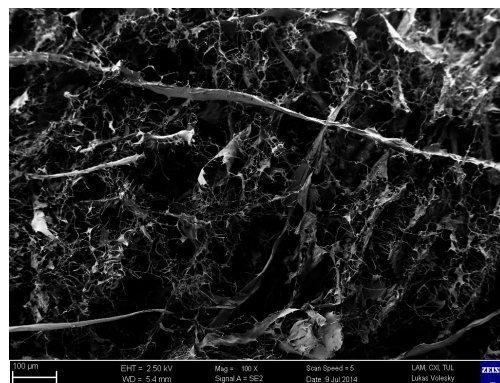
Obr. 15: Struktura CMC filmu před lyofilizací



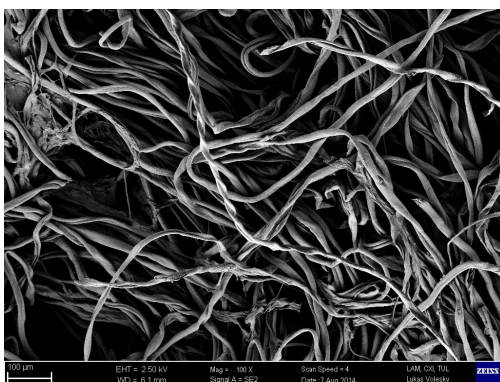
Obr. 16: Struktura CMC filmu po lyofilizaci



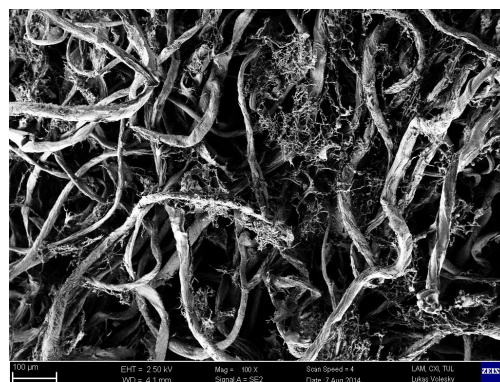
Obr. 17: Struktura CMC filmu tvořeného rozpuštěním netkané textilie před lyofilizací



Obr. 18: Struktura CMC filmu tvořeného rozpuštěním netkané textilie po lyofilizaci



Obr. 19: Struktura CMC netkané textilie před lyofilizací



Obr. 20: Struktura CMC netkané textilie po lyofilizaci

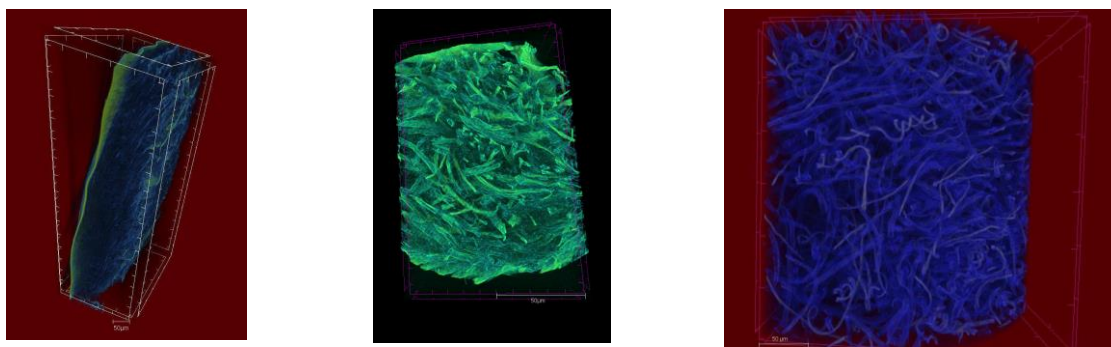
Z Obr. 18 a Obr. 20 je zřejmé, že v případě CMC filmu po lyofilizaci nastaly výrazné změny ve struktuře. Všechny tři testované materiály mají gelový charakter. Gelující oblasti v materiálech vytvořily „nanostrukturu“ za nízkého tlaku.

Výsledná struktura byla fixována sušením při nízké teplotě. Na Obr. 21 lze vidět, že všechny vzorky po lyofilizaci vytvořily pěnovou strukturu.



Obr. 21: Fotografie testovaných vzorků: CMC film (vlevo), CMC film z netkané textilie (uprostřed) a CMC netkaná textilie (vpravo)

Snímky řezů pořízených pomocí počítačového tomografu ukazují (Obr. 22), že vzorek filmu z netkané textilie i vzorek netkané textilie si po lyofilizaci zachovaly vláknennou strukturu.



Obr. 22: Snímky z CT testovaných vzorků: CMC film (vlevo), CMC film z netkané textilie (uprostřed) a CMC netkaná textilie (vpravo)

Tab. 8: Termoizolační vlastnosti (\pm směrodatná odchylka)

	Tepelná vodivost	Tepelná jímavost	Tepelný odpor	Tloušťka	CTS (-20 °C)
	$\lambda (\cdot 10^{-3})$	b	$r (\cdot 10^{-3})$	h	
Vzorek	$[W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}]$	$[W \cdot s^{1/2} \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}]$	$[W^{-1} \cdot K \cdot m^2]$	[mm]	[°C]
1	$32,40 \pm 0,8$	$94,53 \pm 1,4$	$40,43 \pm 0,5$	$1,15 \pm 0,1$	$22,50 \pm 1,1$
2	$48,03 \pm 1,1$	$40,16 \pm 0,4$	$192,00 \pm 1,3$	$9,20 \pm 0,3$	$-2,40 \pm 0,3$
3	$102,57 \pm 1,4$	$305,33 \pm 1,7$	$29,87 \pm 0,2$	$1,45 \pm 0,2$	$15,90 \pm 0,8$
4	$83,27 \pm 1,4$	$86,00 \pm 1,2$	$102,30 \pm 0,9$	$14,19 \pm 0,6$	$-6,90 \pm 0,4$
5	$34,06 \pm 0,9$	$78,23 \pm 0,9$	$36,00 \pm 0,2$	$1,21 \pm 0,1$	$18,90 \pm 0,6$
6	$41,66 \pm 0,4$	$56,63 \pm 0,7$	$112,00 \pm 0,6$	$3,37 \pm 0,2$	$-0,40 \pm 0,1$

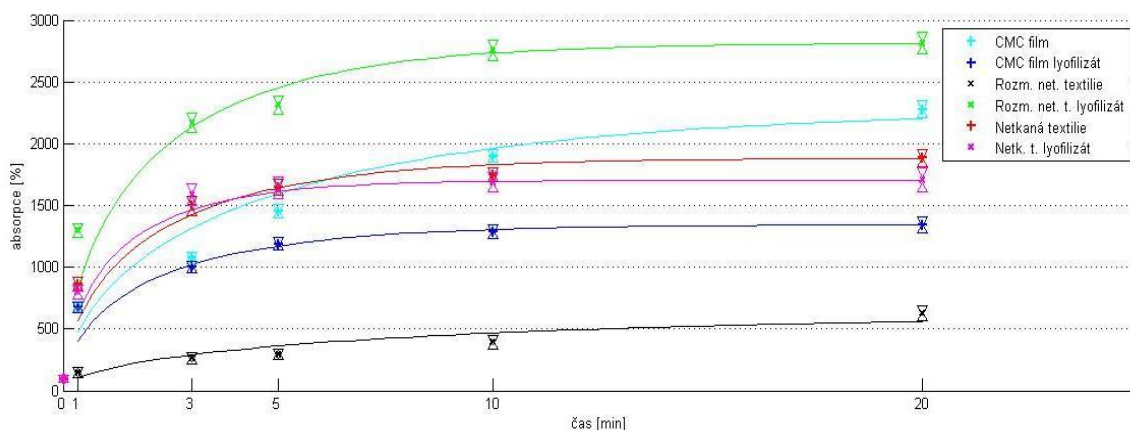
V případě vysoké hodnoty tepelné jímavosti má materiál na dotyk studený omak a naopak, je-li hodnota nízká je materiál na dotyk hřejivý. Vyšší hodnota tepelného odporu znamená, že je materiál méně schopný odvádět teplo. To ukazuje na dobrou schopnost materiálu teplo udržet. Vyšší teplota měřená digitálním infračerveným teploměrem (CTS) znamená horší tepelně izolační vlastnosti. Prodyšnost vzorků filmů se po lyofilizaci mírně zvýšila viz Tab. 9.

Tab. 9: Prodyšnost

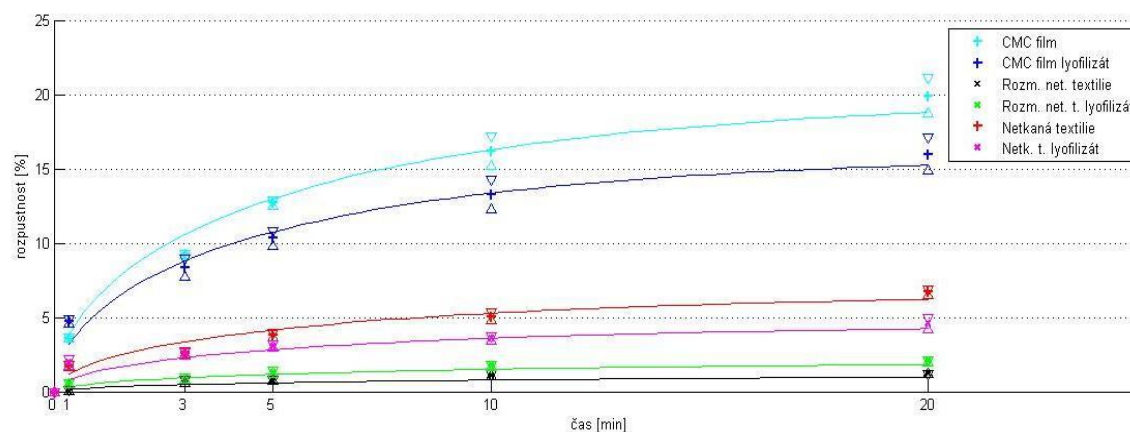
Vzorek	1	2	3	4	5	6
$[l/m^2/s]$	$0,0 \pm 0,0$	$62,4 \pm 1,3$	$0,0 \pm 0,0$	$137,6 \pm 1,6$	$1660,0 \pm 3,5$	$29,6 \pm 1,2$

Vzorek CMC filmu po lyofilizaci dosáhl nižší hodnoty absorpce vody, než tomu bylo u vzorku před lyofilizací. Vzorek filmu vyrobeného rozpuštěním netkané textilie po lyofilizaci dosáhl téměř 5x vyšší hodnoty ve srovnání s absorpcí vzorku

před lyofilizací. Lyofilizace nemá významný vliv na absorpci v případě netkané textilie (viz Graf 12).



Graf 12: Absorpce testovaných vzorků



Graf 13: Rozpustnost testovaných vzorků

Z Graf 13 je patrné, že v případě CMC filmu po lyofilizaci se rozpustnost snížila přibližně o 5 % v porovnání se vzorkem, který nebyl lyofilizován. Lyofilizace významně neovlivňuje rozpustnost vzorku filmu vytvořeného rozpuštěním netkané textilie ve vodě a vzorku netkané textilie jako takové.

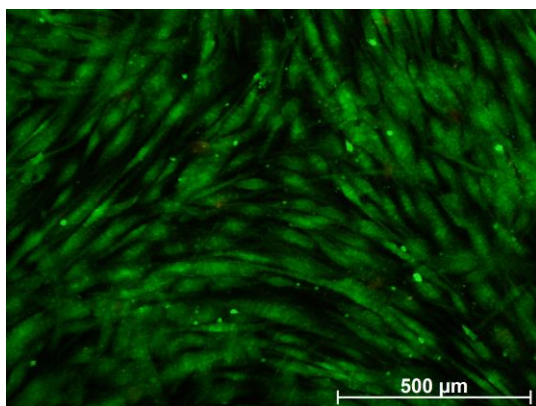
4.3.1 Vhodnost lyofilizátů pro proliferaci buněk

Testování cytotoxicity bylo provedeno dvěma různými metodami. Přesněji se jednalo o metody XTT a Live/Dead. Příprava buněk i jednotlivých testů probíhala ve sterilních podmínkách v laminární komoře. Testy byly prováděny dle normy PN-EN ISO 10993-5. Každému experimentu vždy předcházelo sklizení a spočítání buněk, které pak byly použity. Pro testování byly použity primární kožní fibroblasty dospělého člověka (ATCC® PCS-201-012™), které jsou bipolární a refraktilní. Testován byl vzorek textilní formy sodné soli CMC (DS 0,345, pH 6,6).

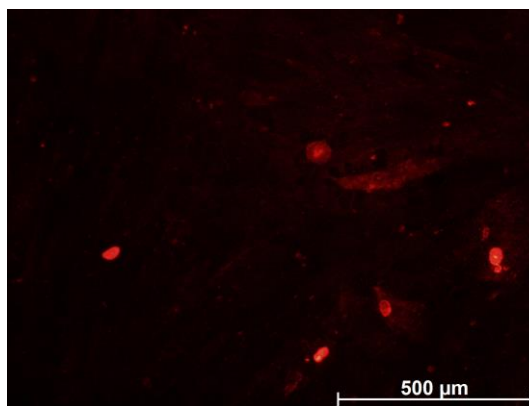
Live/Dead (Testy viability využívající aktivity esteráz)

Plát s jamkami se vzorky a vyšetými buňkami se umístil do inkubátoru po dobu 48 hodin. Vzorky se poté 2x opláchly pomocí PBS, poté se na vzorky aplikoval barvicí roztok. Poté se vzorky opět propláchly 2x puřem. Poté se již vzorky zkoumaly pomocí fluorescenčního mikroskopu za použití filtru 4 a 5.

Testování touto metodou opět nebylo zcela jednoduché díky silné fluorescenci samotných vzorků. Z důvodu silné fluorescence nebylo možné pořídít dostatek snímků mrtvých buněk k počítání.

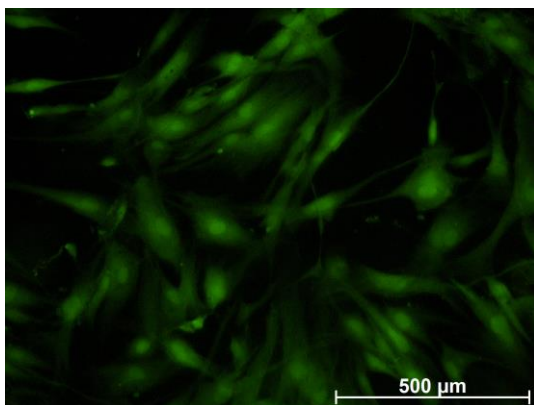


Obr. 23: Kontrolní vzorek – živé buňky

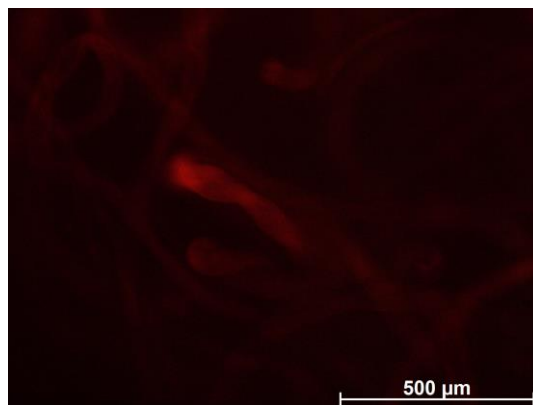


Obr. 24: Kontrolní vzorek – mrtvé buňky

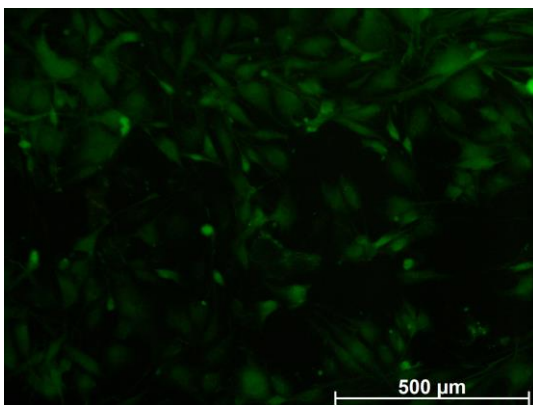
Z Obr. 23 a Obr. 24 je zřejmé, že fibroblasty dobře udržují zelený Calcein v cytoplasmě a vykazují normální morfologii. Z důvodu zájmu o to, zda jsou buňky života schopny i v okolí vzorků byly snímány i jamky pod vzorky.



Obr. 25: Lyofilizát netk. textilie – živé buňky



Obr. 26: Lyofilizát netk. textilie – mrtvé buňky

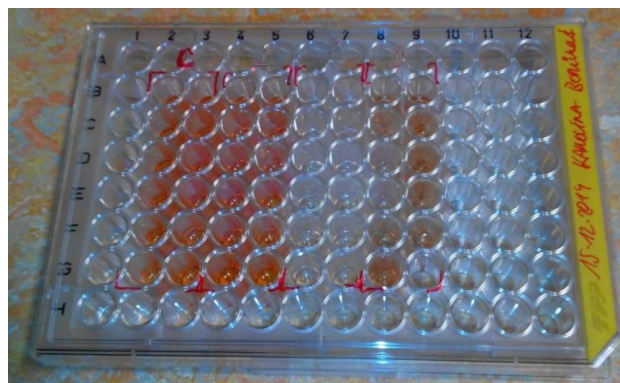


Obr. 27: Lyofilizát – živé buňky, jamka pod vzorkem

Ze snímků (Obr. 25, Obr. 26 a Obr. 27) je patrný vyšší výskyt živých buněk jak na samotném vzorku, tak i v jeho okolí. Nebyla nalezena žádná mrtvá buňka.

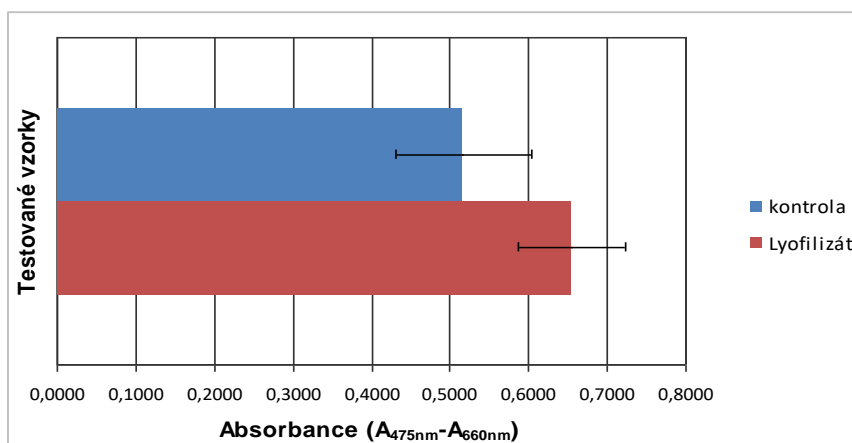
XTT (stanovení cytotoxicity)

Extrakty byly připraveny dle normy PN-EN ISO 10993-12. Test byl veden dle manuálu [80]. Pro všechny provedené testy byl reakční čas v inkubátoru 3 hodiny a 40 minut. Následně byla měřena absorbance jednotlivých jamek. Test byl 5x zopakován. Ukázka XTT testu je zobrazena na Obr. 28.



Obr. 28: Ukázka reakce XTT

Vyšší naměřená hodnota absorbance znamená vyšší množství živých buněk. Měření cytotoxicity jasně poukazuje na fakt, že vzorek lyofilizátu je vhodný pro růst a proliferaci buněk viz. Graf 14.



Graf 14: Výsledky XTT testu

4.4 In vitro testování modifikovaných vzorků s alaptidem

Roztok alaptidu pro následnou inkorporaci do vzorků karboxymethylcelulózy byl připraven rozpuštěním 0,4 g alaptidu (LGM Pharma) v 200 ml směsi voda/ethylen (1:1). Vzorky různých forem karboxymethylcelulózy o hmotnosti 2 g byly ponořeny do 50 ml roztoku s alaptidem po dobu 3 minut a poté zlyofilizovány obvyklým způsobem, který již byl uveden. Celkem byly otestovány 3 typy materiálů s označením:

- CMCNa (film připravený z roztoku karboxymethylcelulózy $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, zesíťný při 180°C po dobu 15 minut)
- NaT (sodná sůl CMC v textilní formě, DS 0,251, pH 6,5)
- HT (kyselá sůl CMC v textilní formě, DS 0,385, pH 4,1)

4.4.1 Stanovení obsahu Alaptidu

Pro měření koncentrace alaptidu byly připraveny výluhy vzorků lyofilizátů různých forem CMC ve fyziologickém roztoku, přičemž vzorky byly louhovány po dobu 7 dní. Následně byly vzorky CMC z výluhů vyjmuty a dále bylo pracováno pouze s výluhy. K potřebám kalibrace byl dodán i vzorek práškového alaptidu. Všechny vzorky byly dále zředěny v poměru 1:5 čistým acetonitrilem HPLC čistoty. Vzorek „Ø Alaptid“ byl dále zředěn 80 % acetonitrilem v poměru 1:10 na konečné ředění 1:50. Před nastříknutím byly všechny vzorky přefiltrovány přes 13 mm nylonový stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,22 μm . Seznam měřených vzorků a naměřené koncentrace alaptidu v měřených ředěných vzorcích a koncentrace přepočtené na původní vzorky jsou zobrazeny v Tab. 10.

Tab. 10: Seznam měřených vzorků a naměřené koncentrace alaptidu v měřených ředěných vzorcích a koncentrace přepočtené na původní vzorky.

Vzorek	ředění	Koncentrace alaptidu ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)	
		Měřený vzorek	Původní vzorek
Ø (roztok) Alaptidu	50x	35,7	1790
NaT + NaCl 0,9 %	5x	6,9	34,4
HT + NaCl 0,9 %	5x	7,3	36,7
CMC + NaCl 0,9 %	5x	12,8	64,1

Vyšší naměřené množství alaptidu ve vzorku výluhu z CMC filmu je způsobeno celkově vyšší schopností absorpce samotného vzorku CMC filmu.

4.4.1.1 HPLC stanovení alaptidu

Byl použit HPLC systém Ultimate 3000 firmy Dionex s připojeným UV-VIS diode array detektorem. Separace probíhala na koloně Kinetex Hilic od firmy Phenomenex. Velikost částic byla 2,6 μm , délka kolony 150 mm a vnitřní průměr kolony 4,6 mm. Byl použit gradient mobilní fáze. Složka A mobilní fáze byla tvořena 5 % acetonitrilem a Složka B byla tvořena čistým acetonitrilem. Byl použit lineární gradient mobilní fáze. Složení gradientu v průběhu analýzy je uvedeno v Tab. 11. Rychlost průtoku mobilní fáze byla po celou dobu 1,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Kolona byla udržována při teplotě 20 °C. Bylo nastříkováno 20 μl vzorku. Detekován byl signál při vlnových délkách 200, 205, 210 a 220 nm. K vyhodnocení obsahu alaptidu byla použita vlnová délka 210 nm. Signál byl zaznamenáván až do doby 6,6 min po nástřiku.

Před nastříknutím byly rovněž přefiltrovány přes 13 mm nylonový stříkačkový filtr s velikostí pórů 0,22 μm . Kalibrační závislost byla sestrojena na základě dodaného alaptidu rozpuštěného v 80 % acetonitrilu. Byly použity kalibrační úrovně 10, 20 a 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a slepý vzorek. Použitý gradient mobilní fáze je zobrazen v Tab. 11.

Tab. 11: Použitý gradient mobilní fáze

<i>tr</i> (min)	Složení mobilní fáze (%)	
	A	B
0	10	90
1,5	10	90
2,5	60	40
3	60	40
3,5	10	90
6,6	10	90

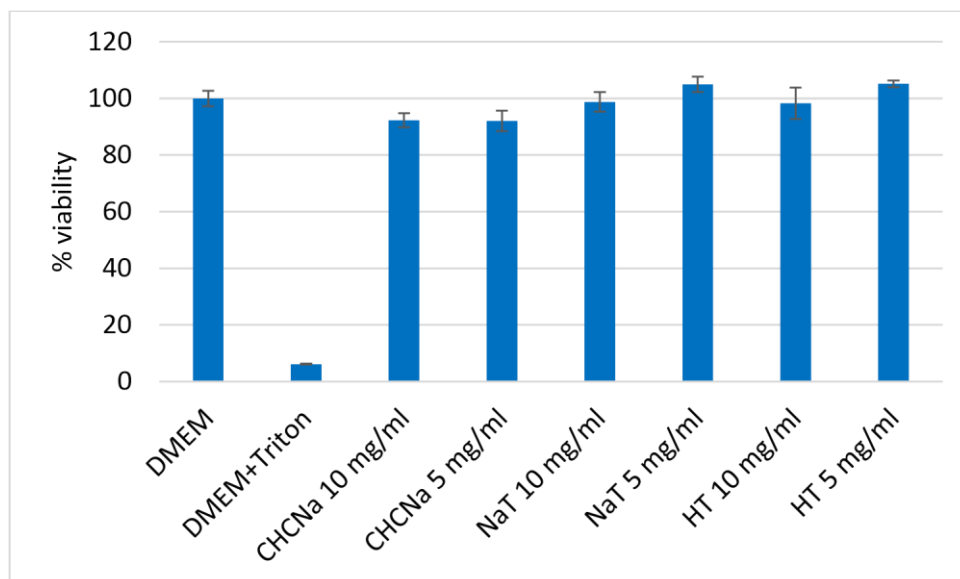
4.4.2 Test cytotoxicity

Před samotným *in vitro* testováním byly vzorky nastříhány na čtverce o velikosti přibližně 1·1 cm a vysterilizovány ethylen oxidem. Po dvou týdnech odvětrávání byl proveden test cytotoxicity dle metodiky ISO 10993-5 s mírnými modifikacemi a test buněčné adheze a proliferace po 48 hodinách inkubace. Oba testy byly provedeny s myšimi 3T3 fibroblasty (ATCC, pasáž 7).

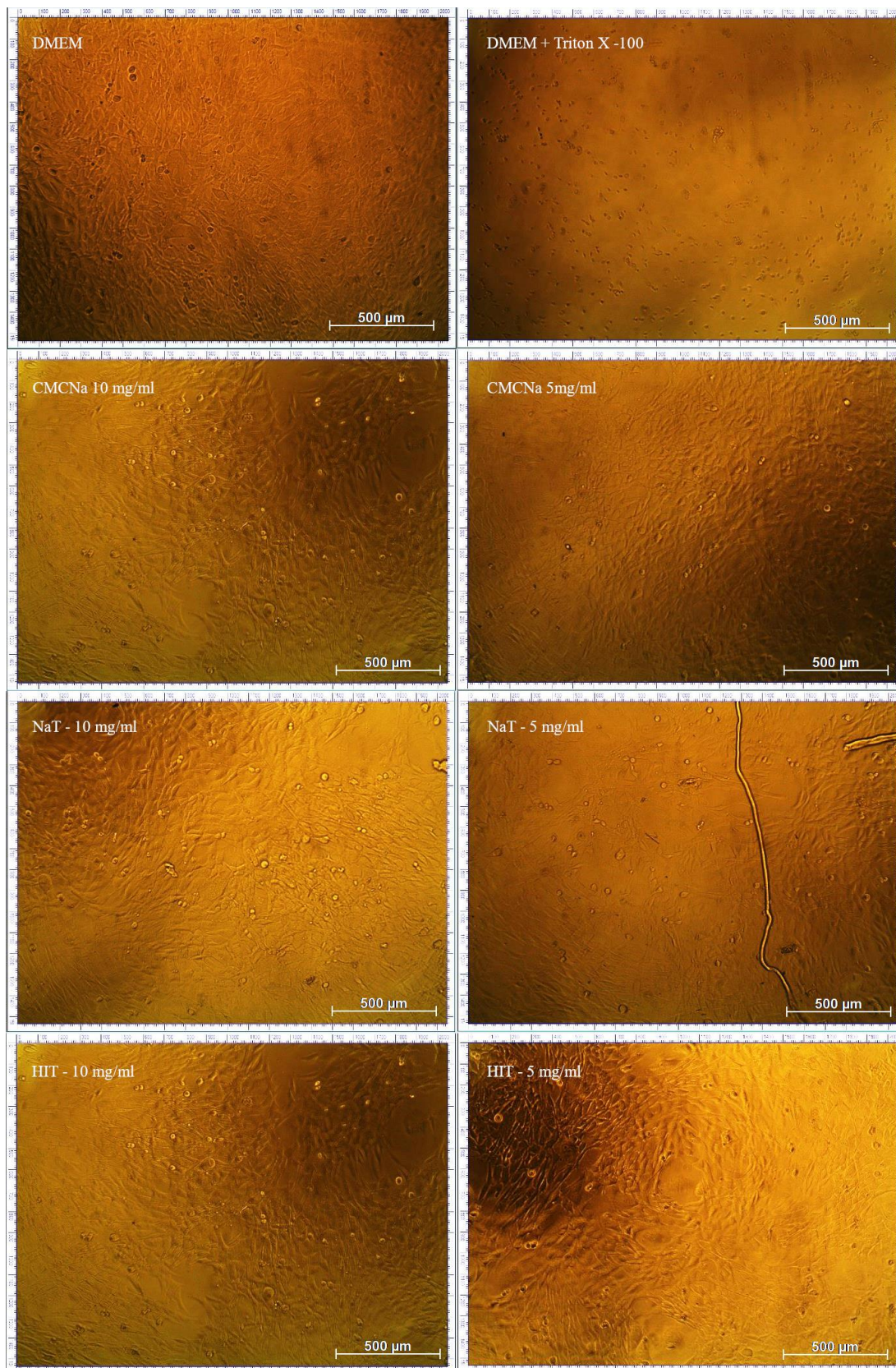
Materiály o přesné hmotnosti (okolo 12 mg) byly umístěny do zkumavky a poté byly smočeny v příslušném objemu kompletního média tak, aby vznikla koncentrace 10 mg materiálu na 1 ml kompletního média. Takto připravené zkumavky se umístily na třepačku (84 rpm, 37 °C) po dobu 24 hodin. Fibroblasty byly nasazeny do 96-ti jamkové destičky o hustotě 10^4 buněk/jamku. Po 24 hodinách kultivace byly buňky zkontrolovány pod mikroskopem a poté k nim bylo připipetováno médium / médium s cytotoxickým Tritonem X-100 (0,1 %) / extrakty testovaných materiálů o koncentracích 10 mg/ml a 5 mg/ml (n=6). Takto připravená destička byla ponechána v inkubátoru po dobu 24 hodin, poté byla měřena viabilita buněk pomocí testu cck-8 (Dojindo).

Buňky inkubované v médiu sloužily jako kontrola viability, která byla považována za 100 %. Buňky v přítomnosti Tritonu X-100 měly naopak viabilitu blížíci se nule. Viabilita buněk inkubovaných s extrakty byla vztažena ke kontrolním buňkám

kultivovaným v médiu. Výsledky testu jsou zobrazeny v Graf 15. Žádný z materiálů nevykazoval cytotoxické působení na buněčnou linii myších fibroblastů. Dle metodiky ISO 10993-5 se za hranici cytotoxicity považuje hranice 70 % viability při použití metabolického MTT testu. V tomto případě byl použit metabolický test cck-8. Nedošlo k výraznému snížení životaschopnosti buněk po inkubaci s extrakty materiálů při obou koncentracích 5 a 10 mg·ml⁻¹. Tento fakt byl potvrzen i mikroskopickým pozorováním buněk na dně kultivační destičky (viz Obr. 29). Zakulacené mrtvé buňky byly pozorovány pouze po inkubaci buněk s Tritonem X-100. V kontrolních jamkách a v jamkách s testovanými extrakty se nacházela konfluentní vrstva nepoškozených buněk.



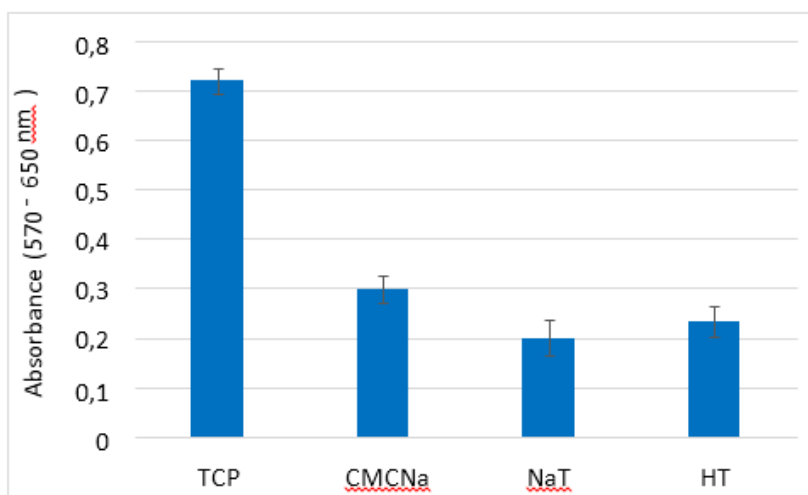
Graf 15: Viabilita fibroblastů po inkubaci buněk s kontrolami a s testovanými extrakty materiálů (n=6)



Obr. 29: Snímky z opti. mikroskopie buněk po 24hodinové inkubaci v médiu 0,1 % Tritonem X-100 s extrakty materiálů CMCNa, NaT a HT o koncentracích 10 mg/ml a 5 mg/ml.

Sterilní materiály o rozměrech přibližně 1·1 cm byly umístěny na dno 24jamkové destičky (n=8). Na jejich povrch byla napipetována buněčná suspenze o koncentraci 10^4 buněk/jamku. Pro kontrolu byly buňky napipetovány i na dno kultivační jamky (tissue culture plastic=TCP, n=6). Po 48 hodinách kultivace měla být hodnocena buněčná adheze a proliferace pomocí metabolického MTT testu a mikroskopických technik. U materiálu CMCNa však došlo k jeho rozpuštění, proto nebylo možné všechny analýzy provést. Byla proto zvolena pouze jediná metoda – měření viability buněk v jamce pomocí MTT testu. Z jamek obsahujících testovaný materiál i z kontrol bylo odsáto médium a byl přidán roztok MTT s médiem, který se ponechal inkubovat po dobu 3 hodin při 37 °C. Poté byl roztok MTT odsát a vzniklé fialové krystaly formazanu byly rozpuštěny okyseleným isopropanolem. Poté byla změřena absorbance roztoku při 570 nm a 650 nm (referenční vlnová délka).

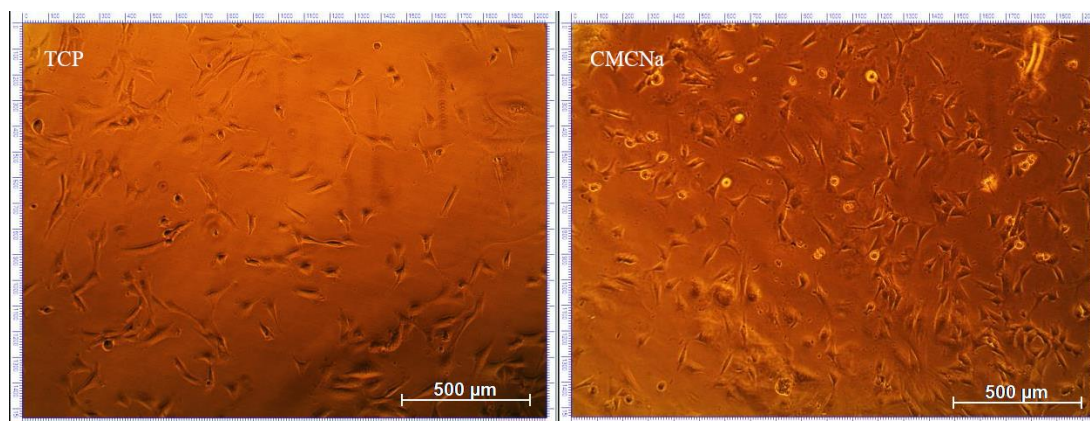
Výsledky buněčné viability vyjádřené jako hodnota rozdílů absorbancí jsou zobrazeny v Graf 16. Největší metabolická aktivita byla naměřena na kontrolním plastiku. Nižší viabilita buněk pak byla naměřena v jamkách s testovanými materiály. Z hodnot není možné odlišit, zda buňky rostly na povrchu daného materiálu nebo jen v jeho okolí. Plocha testovaného vzorku (1 cm²) se lišila od plochy dna kultivační jamky (2 cm²), proto může být porovnání viability buněk zavádějící.



Graf 16: Metabolická aktivita buněk měřená pomocí MTT testu na dně kultivační jamky a v jamkách s testovanými materiály (n≥6)

Morfologie buněk na dně jamek, případně v okolí testovaných materiálů NaT a HT byly sledovány pomocí optické mikroskopie (viz Obr. 30). Buňky nevykazovaly

žádné abnormality. Nižší viabilita naměřená v jamkách s testovanými materiály mohla být způsobena pouze nižší adhezí buněk na samotné povrchy materiálů, které nebyly zkoumány z důvodu rozpuštění jednoho z testovaných materiálů (CMCNa).



Obr. 30: Snímky z optické mikroskopie buněk po 48hodinové kultivaci na dně kultivační jamky (TCP), s obsahem materiálu CMCNa, na rozhraní s materiálem NaT a HT

Testované materiály nevyvolávají cytotoxickou odezvu u myších 3T3 fibroblastů v koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a nižší. Míra adheze a proliferace na materiálech se nepovedla kvantifikovat, jelikož došlo k rozpuštění materiálu CMCNa během 48hodinové inkubace v médiu.

4.5 Modifikace CMC substrátů nanočásticemi stříbra – antibakteriální krytí

V této kapitole je prezentována příprava materiálů, které obsahují nanočástice stříbra v polymerní matrici, která je schopna absorbovat extrémní množství vody.

4.5.1 Redukce nanočástic stříbra teplem

Použitá metoda přípravy nanočástic stříbra je založena na redukcí stříbrné soli. Z této studie vyplynulo, že během reakce stříbrných iontů s CMC se vytváří málo rozpustná stříbrná sůl CMC. Následné zahřívání vedlo k redukcí nanočástic stříbra ve hmotě CMC.

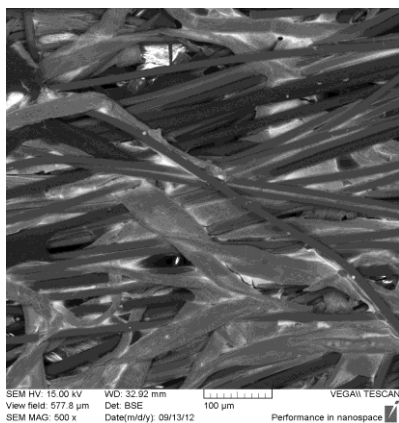
Příklad

Sodná sůl CMC byla použita v práškové formě, která byla rozmíchána ve vodě k dosažení koncentrace roztoku $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Krystalky AgNO_3 byly rozpuštěny ve vodě k získání koncentrace $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Stejně množství obou zmíněných roztoků bylo smícháno dohromady tak, aby výsledný roztok obsahoval $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ CMC a $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ dusičnanu stříbrného.

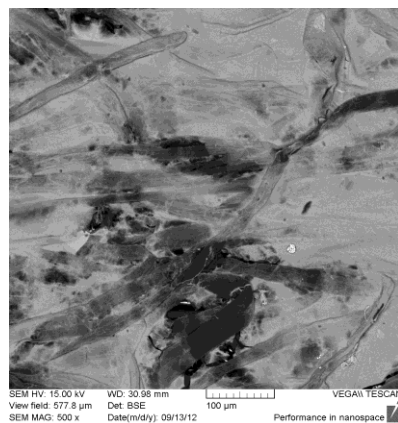
Takto připravený roztok byl nanesen klocovací technikou na dva textilní materiály (PES wet-laid (textilie vyrobená za mokra) – $m_s 32 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, tloušťka 1 mm, PES vatelín – $m_s 94 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, tloušťka 4 mm). Všechny vzorky byly poté umístěny do sušárny, kde byly sušeny při 105°C a fixovány při 180°C a 200°C po dobu 5 – 30 minut.

Z výsledků experimentů je patrné, že při nižších teplotách vzniká stříbrná sůl CMC, a naopak při vyšších teplotách jsou redukovány stříbrné nanočástice. EDS analýza (viz Graf 17 a Graf 18) ukazuje, že nanočástice stříbra jsou v CMC rozmístěny ve formě velmi malých částic nebo iontů v celulóзовé matrici.

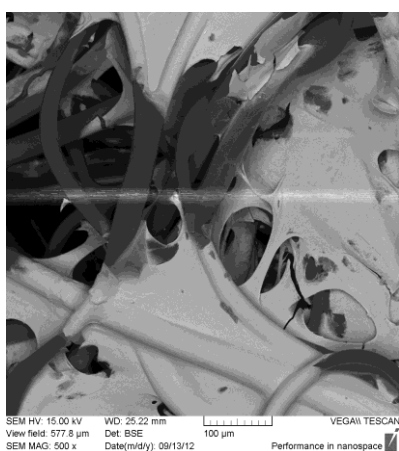
Snímky z elektronové mikroskopie jsou vyobrazeny na Obr. 31 až Obr. 34.



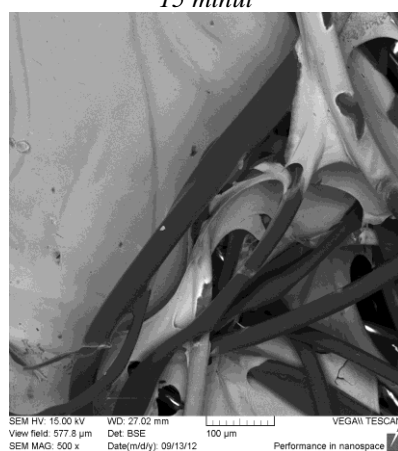
Obr. 31: SEM (BSE) vzorku PES wet laid, který je upraven, sušen a fixován při 180 °C po dobu 15 minut



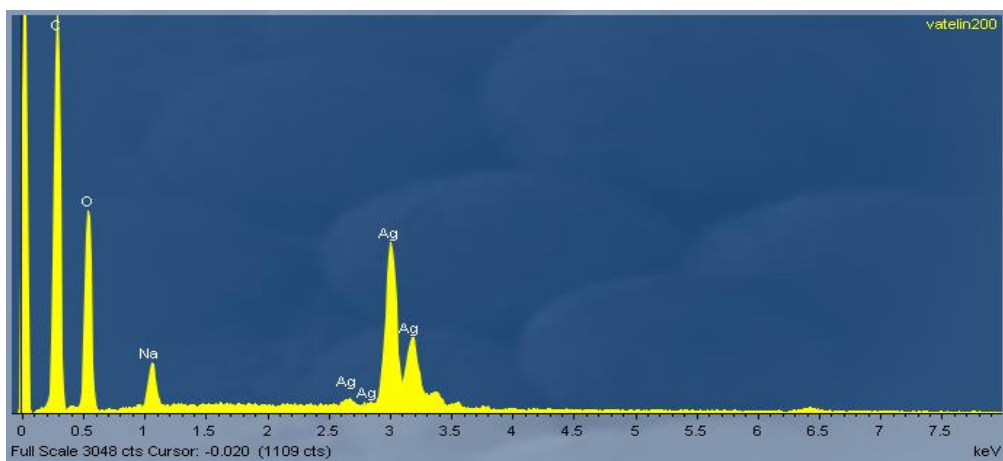
Obr. 32: SEM (BSE) vzorku PES wet laid, který je upraven, sušen a fixován při 200 °C po dobu 15 minut



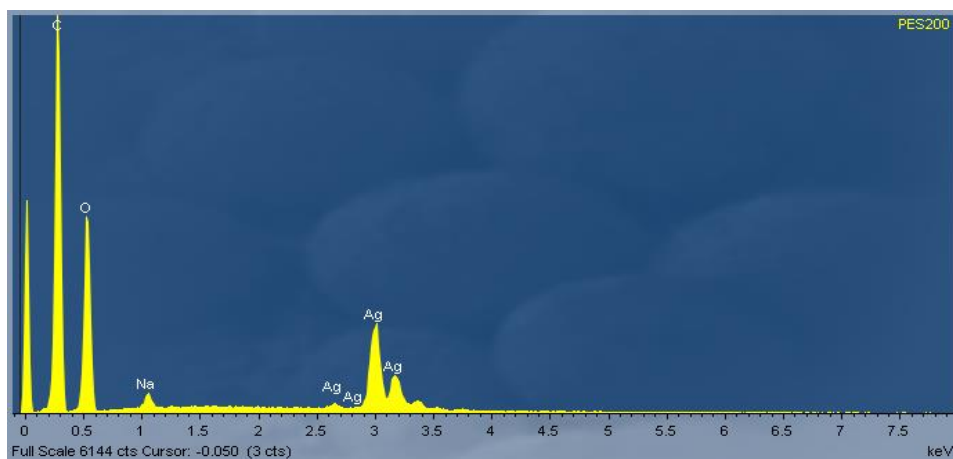
Obr. 33: SEM (BSE) vzorku PES vatelin, který je upraven, sušen a fixován při 180 °C po dobu 15 minut



Obr. 34: SEM (BSE) vzorku PES vatelin, který je upraven, sušen a fixován při 200 °C po dobu 15 minut

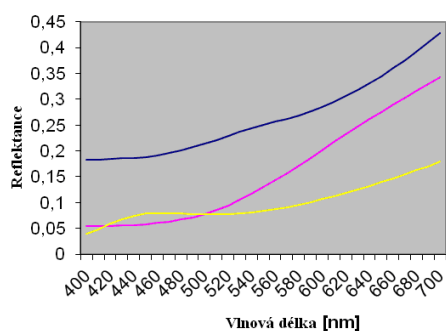


Graf 17: EDS spektrum vzorku PES vatelinu, sušeného a fixovaného při 200 °C po dobu 15 minut

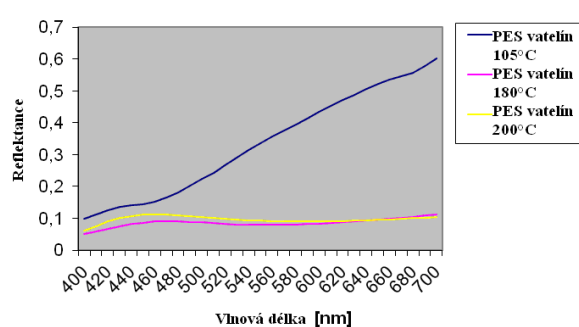


Graf 18: EDS spektrum vzorku PES wet laid, sušeného a fixovaného při 200 °C po dobu 15 minut

Existuje korelace mezi teplotou a viditelným tmavnutím testovaných vzorků. Tmavnutí vzorků je znázorněno na Graf 19 a Graf 20. Výsledný produkt obsahuje málo rozpustné stříbro ve formě nanočástic a málo rozpustné stříbrné soli CMC.



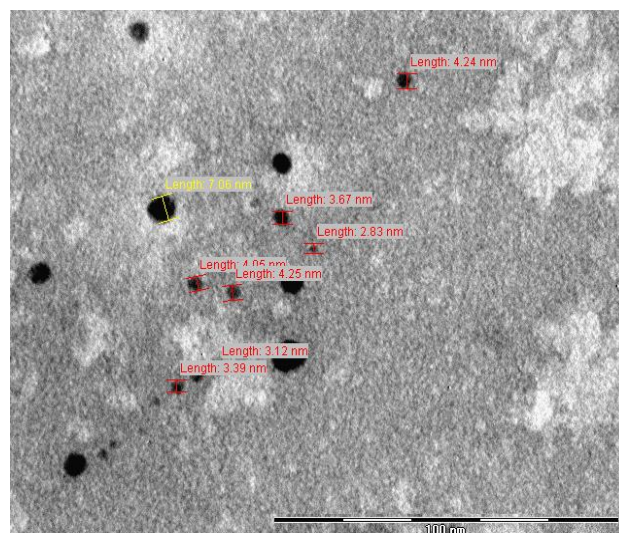
Graf 19: Změna jasu PES vatelinu



Graf 20: Změna jasu vzorku PES wet laid

Z již zmíněných obrázků je patrné, že vzorky jsou tím tmavší, čím vyšší je teplota fixace. Nižší hodnota reflektance znamená tmavší vzorek.

Analýza s využitím TEM demonstruje, že vzorky opravdu obsahují nanočástice stříbra (viz Obr. 35). Bylo změřeno 100 částic a následně byla stanovena průměrná velikost částic 4,55 nm. Tyto částice jsou neagregované a mají kulovitý tvar.



Obr. 35: Vzorek CMC filmu, který byl upraven, sušen a fixován při 200 °C po dobu 15 minut

Kvantitativní hodnocení antibakteriální aktivity vzorků prokázalo u všech testovaných vzorků výborný antibakteriální efekt, rozdíly jsou zanedbatelné a pohybují se v jednotkách bakteriálních kolonií, což lze vidět v Tab. 12 a Tab. 13.

Tab. 12: Výsledky metody AATCC 147 pro vzorek PES wet laid

Vzorek	Escherichia coli	Staphylococcus aureus
PES wet laid - standard	2	6
PES wet laid 105 °C - 15 min	0	2
PES wet laid 180 °C - 15 min	0	0
PES wet laid 200 °C - 15 min	0	0

Tab. 13: Výsledky metody AATCC 147 pro vzorek PES vatelín

Vzorek	Escherichia coli	Staphylococcus aureus
PES vatelín - standard	12	cca 150
PES vatelín 105 °C - 15 min	0	0
PES vatelín 180 °C - 15 min	0	0
PES vatelín 200 °C - 15 min	0	1

4.5.2 Redukce nanočástic stříbra pomocí UV

CMC se vlivem UV záření rozkládá na volné radikály. Ty poté způsobují redukci stříbrných iontů na nanočástice kovového stříbra. Z výsledků experimentů vyplývá, že směsové UVA/UVB záření je s ohledem na redukci nanočástic stříbra účinnější než čisté UVA záření.

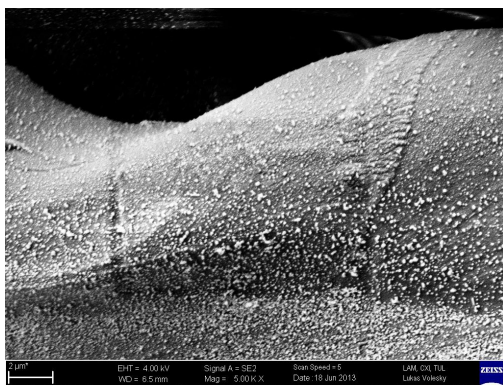
Příklad

Krystalky AgNO_3 byly rozpuštěny ve vodě k získání koncentrace $0,33 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Oba vzorky CMC (Vzorek 1 – kyselý typ (pH 4,1, DS 0,385) – netkaná textilie, $m_s 60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, Vzorek 2 – neutrální typ (pH 6,5, DS 0,251) – netkaná textilie, $m_s \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$) byly ponořeny do roztoku dusičnanu stříbrného po dobu 30 minut. Dále byly vzorky zasušeny při teplotě 105°C . Do roztoku dusičnanu stříbrného byl přidán 1 ml glycerinu, aby se při následném sušení zabránilo ztvrdnutí vzorku. Po sušení byly vzorky vystaveny UV záření. Polovina vzorků byla vložena do UV skříně, kde byly vystaveny směsi paprsků podobných jako u přírodního slunce. Druhá polovina byla ponechána na denním světle (bez jakéhokoli osvětlení v laboratoři).

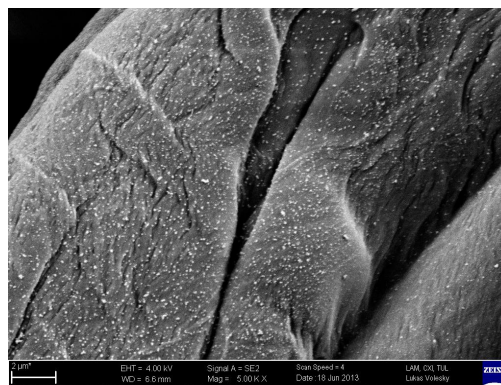
Specifikace použité žárovky v UV skříně:

Ultra Vitalux 300 W E27, Osram – „umělé Slunce“

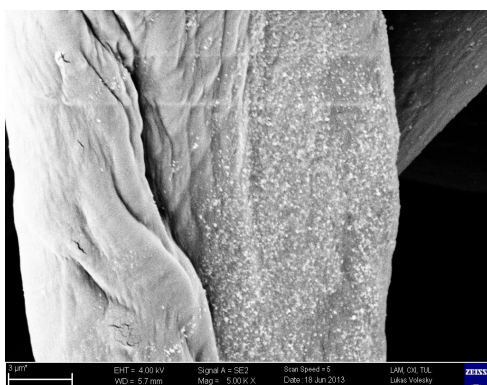
- UVA výkon záření 315...400 nm 13,6 W
- UVB výkon záření 280...315 nm 3,0 W



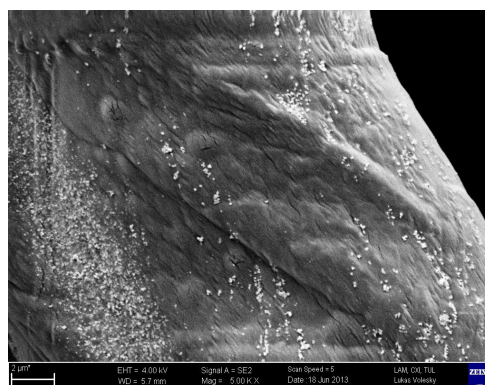
Obr. 36: vzorek 1 - Vitalux



Obr. 37: vzorek 1- denní světlo



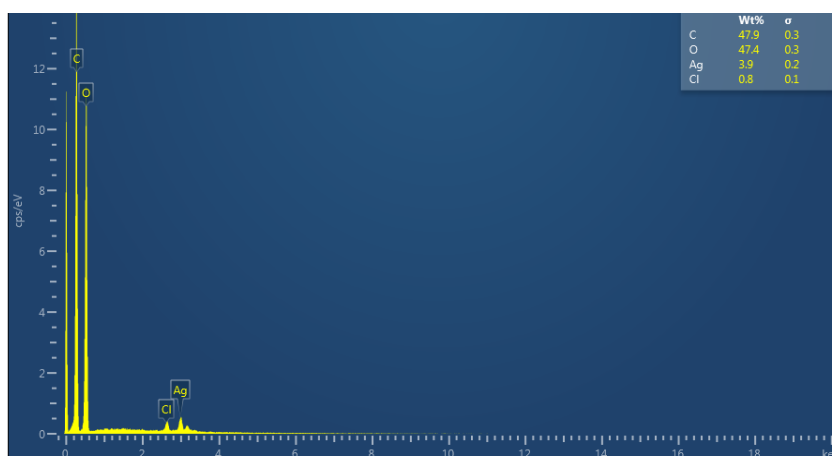
Obr. 38: vzorek 2 - Vitalux



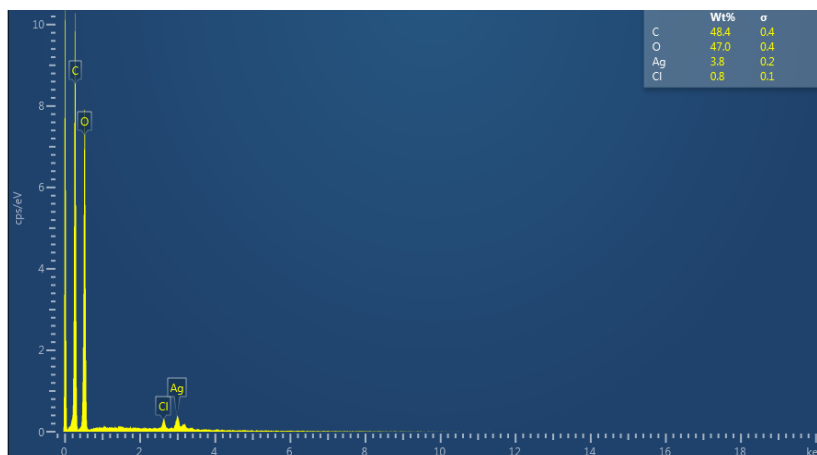
Obr. 39: vzorek 2 - denní světlo

Snímky z elektronové mikroskopie jsou vyobrazeny v Obr. 36 až Obr. 39. Rozdíl mezi metodami je v čase vystavení oběma typům záření. Vzorky, které byly umístěny do UV skříně, byly vystaveny záření po dobu 2 hodin. Přičemž vzorky, které

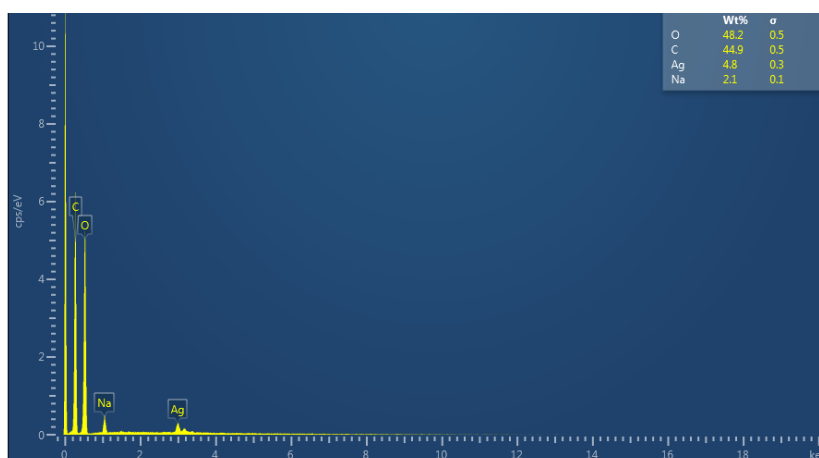
byly ponechány na denním světle, byly záření vystaveny po dobu 24 hodin. Doba ozařování byla stanovena podle změny barevnosti vzorku.



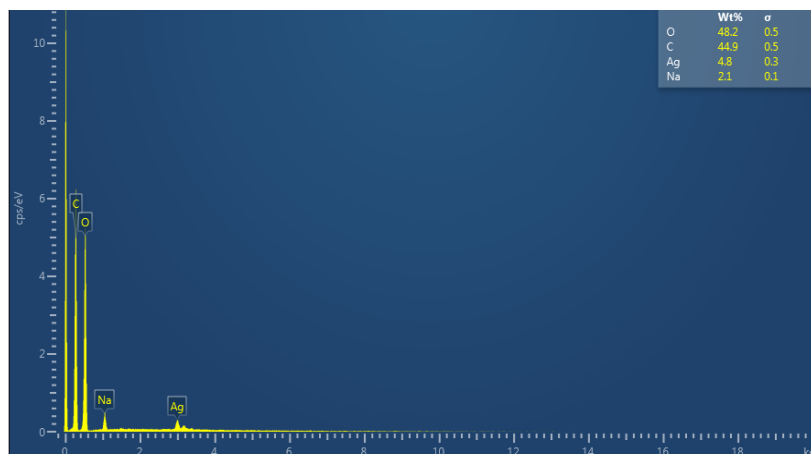
Graf 21: EDS spektrum vzorku 1 – Vitalux



Graf 22: EDS spektrum vzorku 1 – denní světlo



Graf 23: EDS spektrum vzorku 2 - Vitalux



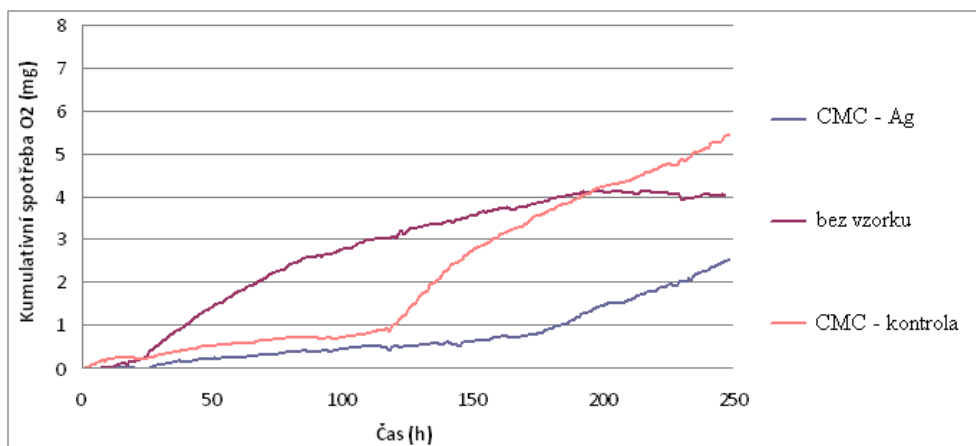
Graf 24: EDS spektrum vzorku 2 - denní světlo

Z uvedených spekter (Graf 21 až Graf 24) vyplývá, že oba typy světla, kterému byly vzorky vystaveny, vyredukovaly přibližně stejné množství stříbra. Pro porovnání byla provedena redukce nanočástic stříbra na stejných materiálech nesměsovým světlem (365 nm), přičemž množství vyredukováného stříbra bylo 4x nižší.

4.5.2.1 Test antibakteriální aktivity

Testován byl vzorek CMC netkané textilie kyselého typu (pH 4,1, DS 0,385, m_s 60 $g \cdot m^{-2}$), který byl následně ponořen do roztoku dusičnanu stříbrného. Krystalky $AgNO_3$ byly rozpuštěny ve vodě k získání koncentrace 1 a 0,1 $g \cdot l^{-1}$. UV ozařování se provedlo v uzavřené komoře s použitím vysoce výkonné halogenové lampy vytvářející silné záření v UVB oblasti (280 – 315 nm) a v oblasti UVA (315 – 380 nm). Vzorek byl ozařován po dobu 3 hodin.

K testování metabolické aktivity bakteriální populace bylo využito respirometrické metody (hodnocení O_2 , CO_2 , CH_4). Do reagenční lahve (o objemu 250 ml) bylo dávkováno 100 ml roztoku (váha vzorků cca. 0,33 g/100 ml). V daných intervalech byly měřeny koncentrace plynů. Experimentálně je ověřeno, že v průběhu 14 dnů měření nedochází k významnému odparu vzorku.



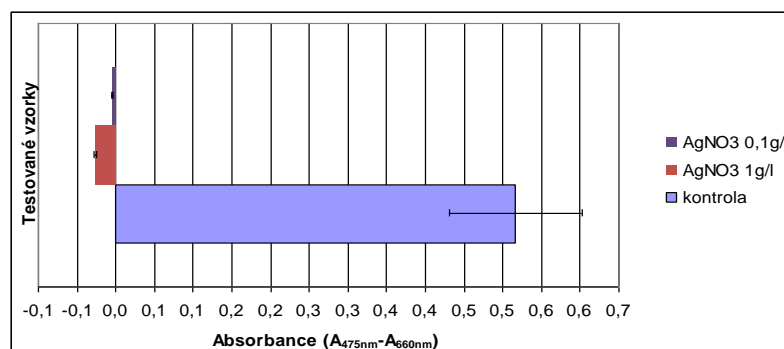
Graf 25: Kumulativní spotřeba kyslíku

Kontrolní vzorek (tj. čistá suspenze bez nosiče) je označen: bez vzorku – z Graf 25 je patrné, že konec respirace nastal v čase cca. 170 hodin, bakterie spotřebovali všechny dodaný substrát (tj. glukosu) a žádný další substrát se již ve vzorku nevyskytuje (tj. u jiných vzorků působí jako substrát daný nosič/látka). Hodnoty kumulativní respirace jsou od času 170 hodin konstantní, vzorek je zcela „mrtvý“.

Přítomnost nanočástic v případě “CMC - Ag” snižuje respirační aktivitu bakterií oproti kontrole. Zvýšená respirace u daného vzorku nastala až v čase cca. 170 hodin, do této doby lze vzorek považovat za zcela „antibakteriální“. Degradace nosiče nenastává, po čase 170 hodin dochází k pozvolnému nárůstu počtu bakterií, tj. respirace se mírně zvyšuje.

4.5.2.2 Test cytotoxicity

Hodnocení cytotoxicity vzorků obsahujících nanočástice stříbra bylo provedeno pomocí XTT testu (test proveden za stejných podmínek a stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.3.1.). Z výsledků testu vyplývá, že vzorky obsahující nanočástice stříbra jsou pro lidské kožní buňky toxické (Graf 26). Vzorky byly rovněž testovány na přítomnost buněk v okolí vzorků a z výsledků snímků z fluorescenčního mikroskopu byly živé buňky v okolí vzorku skutečně nalezeny.



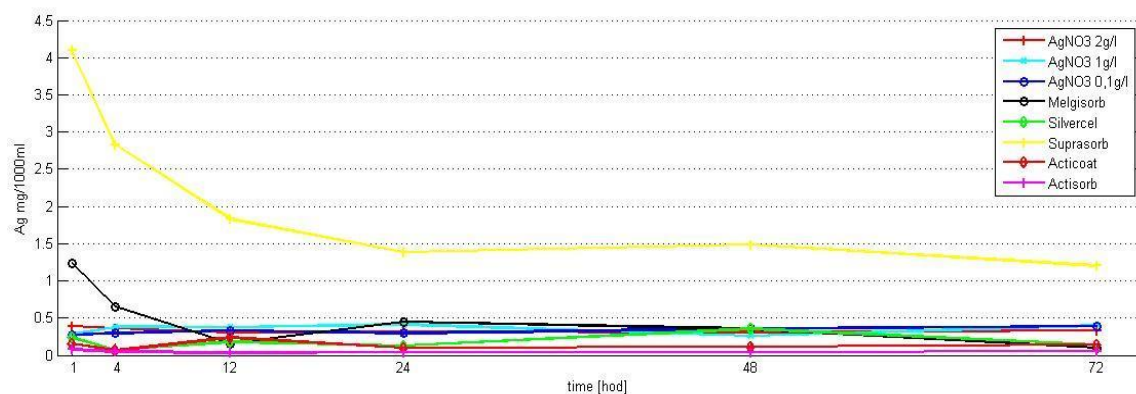
Graf 26: Výsledky XTT testu

U vzorků CMC s obsahem stříbra byla rovněž EDS a ICP analýza, která byla provedena za účelem zjištění, zdali a jaké množství stříbra se ze vzorků uvolňuje. V případě ICP analýzy byly vzorky o definované hmotnosti namočený v definovaném objemu fyziologického roztoku po dobu 1 – 72 hodin. Výsledky obou analýz byly porovnány s výsledky komerčně prodáváných produktů, které obsahují stříbro a používají se jako krytí ran. V Tab. 14 jsou zobrazeny výsledky obsahu stříbra ve vzorcích měřených pomocí EDS analýzy.

Tab. 14: Obsah stříbra pomocí EDS

	Ag [Wt %]
HT (AgNO₃ 0,1 g·l⁻¹)	17,1 ± 0,2
HT (AgNO₃ 1 g·l⁻¹)	21,8 ± 0,2
HT (AgNO₃ 2 g·l⁻¹)	20,5 ± 0,2
Melgisorb	0,7 ± 0,1
Silvercel	41,5 ± 0,3
Suprasorb	1,7 ± 0,1
Acticoat	35,7 ± 0,2
Actisorb	0,4 ± 0,1

Z výsledků ICP analýzy (Graf 27) vyplývá, že z CMC netkané textilie obsahující nanočástice a ionty stříbra se uvolňuje množství stříbra nezávisle na době louhování či množství použitého dusičnanu stříbrného (množství uvolněného stříbra 0,3 mg·l⁻¹). Komerčně prodávaná krytí s obsahem stříbra uvolňují 0,03 – 4,1 mg·l⁻¹ stříbra.



Graf 27: ICP – množství vylouhovaného stříbra ze vzorků

4.5.3 Redukce nanočástic stříbra pomocí vitamínu C

V této studii je prezentována příprava CMC filmů s obsahem nanočástic stříbra, redukčním činidlem byla v tomto případě kyselina askorbová.

Příklad

Byla použita sodná sůl CMC v práškové a vlákenné podobě. Z práškové formy sodné soli byl připraven roztok o koncentraci $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, z kterého byl sušením připraven film. Vlákenná podoba sodné soli CMC (DS 0,345, pH 6,6) byla rozpuštěna ve vodě pro dosažení roztoku o koncentraci CMC $17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, z kterého byl rovněž připraven film.

Tab. 15: Složení jednotlivých roztoků o objemu 50 ml

Vzorek	CMC	Množství CMC [W%]	Dusičnan stříbrný [W%]	Kyselina askorbová [W%]	Glycerin [W%]
1	práš. forma	2	0	3	2
2	rozp. textilie	1,7	0	3	2
3	práš. forma	2	0,03	0,75	2
4	rozp. textilie	1,7	0,03	0,75	2
5	práš. forma	2	0,06	1	2
6	rozp. textilie	1,7	0,06	1	2

4.5.3.1 Antibakteriální aktivita

Tergitol 7 Agar Base (HiMedia) – test na E. coli

Výsledky hodnocení inhibiční zóny při použití agaru Tergitol 7 jsou zobrazeny v Tab. 16.

Tab. 16: Výsledky antibakteriální aktivity vzorků při použití agaru Tergitol 7 (hodnocena velikost inhibiční zóny)

Vzorek	<i>Escherichia coli</i> (10^3 CFU·ml ⁻¹)
1	bez halo zóny
2	halo zóna 4 mm
3	bez halo zóny
4	bez halo zóny
5	halo zóna 5 mm
6	halo zóna 5 mm



Obr. 40: Vzorek č. 2 - rozp. textilie

Krevní agar

Výsledky hodnocení inhibiční zóny při použití krevního agaru jsou zobrazeny v Tab. 17.

Tab. 17: Výsledky antibakteriální aktivity vzorků při použití AATCC 147 (hodnocena velikost inhibiční zóny)

Vzorek	<i>Staphylococcus aureus</i> (10^5 CFU·ml ⁻¹)	<i>Escherichia coli</i> (10^5 CFU·ml ⁻¹)
Vzorek č. 1	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 1,8 cm	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 1,5 cm
Vzorek č. 2	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 2,2 cm	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 2,1 cm
Vzorek č. 3	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 0,7 cm	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 0,6 cm
Vzorek č. 4	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 0,2 cm	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 0,7 cm
Vzorek č. 5	Bez inhibičního efektu, pozorována hemolýza, průměr 0,7 cm	Náznak inhibice, pozorována hemolýza, průměr 0,6 cm
Vzorek č. 6	Inhibiční zóna 0,4 cm, pozorována hemolýza, průměr 0,9 cm	Inhibiční zóna 0,1 cm, pozorována hemolýza, průměr 0,8 cm

Tab. 18: Výsledky antibakteriální aktivity vzorků při použití AATCC 100

Vzorek	Staphylococcus aureus (10 ⁵ CFU·ml ⁻¹)	Escherichia coli (10 ⁵ CFU·ml ⁻¹)
Vzorek č. 1	4 plísňe, 150 bakterií	15 plísňí, kompaktní výsev bakterie
Vzorek č. 2	50 bakterií	60 bakterií
Vzorek č. 3	120 bakterií	45 bakterií
Vzorek č. 4	85 bakterií	35 bakterií
Vzorek č. 5	5 plísňí, 120 bakterií	2 plísňe, 150 bakterií
Vzorek č. 6	150 bakterií	22 bakterií

Kontaktní kvalitativní metodou AATCC147 vykazuje „nejlepší antibakteriální efekt“ vzorek č. 6 a to na oba testované patogenní bakteriální kmeny. Ostatní vzorky vykazují zejména hemolýzu (porušení cytoplazmatické membrány červených krvinek, tj. předčasný zánik erytrocytů – v krevním agaru).

U kvantitativní metody AATCC100 (viz Tab. 18) se objevily plísňe i bakterie. V případě E. coli byl nejlepší výsledek pozorován u vzorku č. 6 (bakteriální inhibice 99,95 %), v případě St. aureus se jednalo o vzorek č. 2 (bakteriální inhibice 99,97 %).

4.5.3.2 Antioxidační vlastnosti

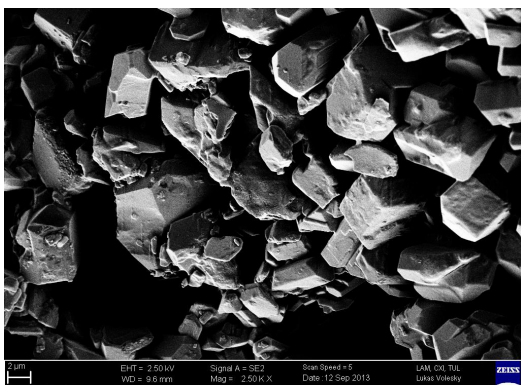
Vzorky č. 1 a 2 byly příliš silné, proto musely být rozpuštěny v 500 ml destilované vodě místo 50 ml. Ve skutečnosti jsou tyto dva vzorky 10x silnější než ostatní testované vzorky. Vyšší pokles absorbance znamená vyšší antioxidační aktivitu. Výsledky antioxidační aktivity jsou uvedeny v Tab. 19.

Tab. 19: Výsledky antioxidační aktivity

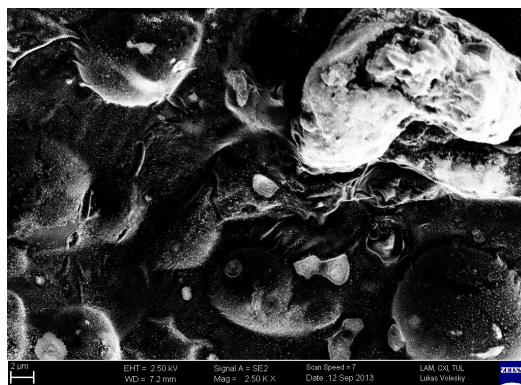
		Pokles absorbance o:
0,3 g vzorku	č. 1	0,470
	č. 2	0,126
0,3 g vzorku	č. 3	0,875
	č. 4	0,590
	č. 5	0,090
	č. 6	0,062

4.5.3.3 Analýza struktury povrchu

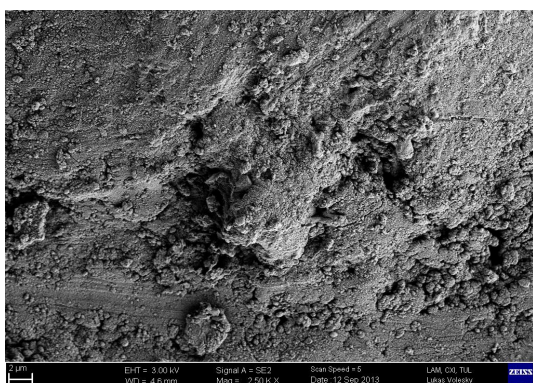
Analýza struktura povrchu byla provedena s využitím skenovací elektronové mikroskopie. Struktura povrchu jednotlivých vzorků je vyobrazena na Obr. 41 až Obr. 46.



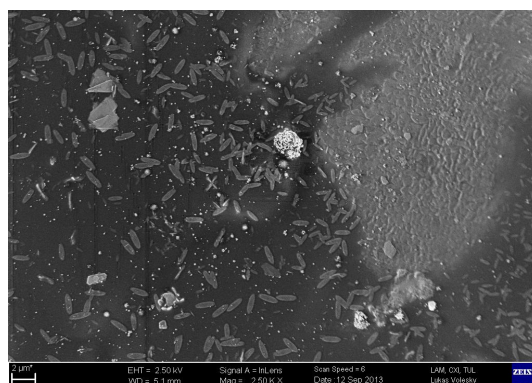
Obr. 41: Snímek ze SEM - vzorek č. 1



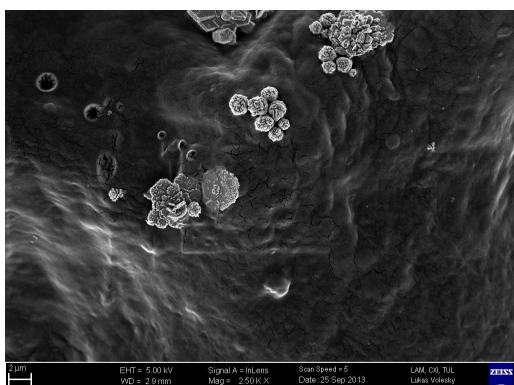
Obr. 42: Snímek ze SEM - vzorek č. 2



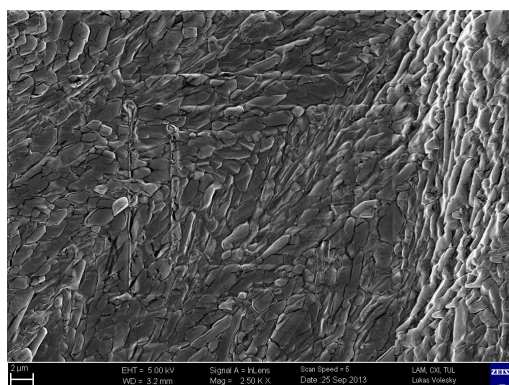
Obr. 43: Snímek ze SEM - vzorek č. 3



Obr. 44: Snímek ze SEM - vzorek č. 4

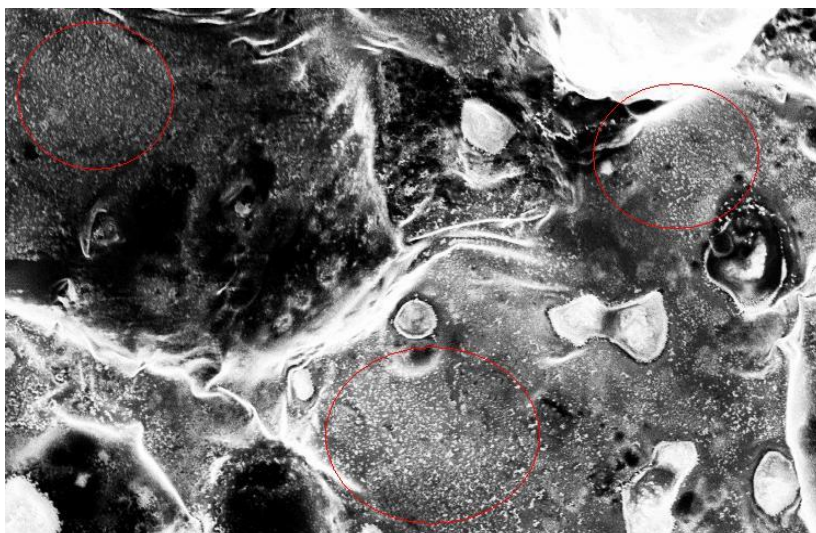


Obr. 45: Snímek ze SEM - vzorek č. 5



Obr. 46: Snímek ze SEM - vzorek č. 6

Z Obr. 41 a Obr. 42 je zřejmé, že filmy bez obsahu stříbra mají ve své struktuře větší částice. Jedná se o vitamín C, který se vykrytalizoval na povrchu filmů. Na Obr. 43 a Obr. 44 je patrná přítomnost nanočástic stříbra.



Obr. 47: Vzorek č. 3 – nanočástice stříbra

V této studii se podařilo připravit materiál, který integruje antimikrobiální a antioxidační vlastnosti a zároveň je vysoce absorpční.

4.6 Porovnání vzorku CMC s obsahem stříbra, CMC lyofilizátu, CMC filmu upraveného plazmatem a CMC filmu zesíťovaného pomocí BDDGE

Všechny testované polymerní vzorky jsou na bázi karboxymethylcelulózy. Testovány byly 4 vzorky, které byly v podobě netkané textilie či filmu.

Vzorek č. 1

První vzorek je funkcionalizovaný nanočásticemi stříbra. Jedná se o vzorek netkané textilie kyselého charakteru (plošná hmotnost $60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, DS 0,385, pH 4,1), která byla ponořena do roztoku dusičnanu stříbrného. Krystalky AgNO_3 byly rozpuštěny ve vodě k získání koncentrace 1 a $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok byl rozmíchán pomocí laboratorního míchadla RZR 2051 po dobu 15 minut, aby byl roztok homogenní. Vzorek byl poté zasušen v horkovzdušné sušárně při teplotě 80°C . Redukce nanočástic stříbra byla provedena pomocí UV záření. Ozařování se provedlo v uzavřené komoře s použitím vysoce výkonné halogenové lampy vytvářející silné záření v UVB oblasti (280 - 315 nm) a v oblasti UVA (315 - 380 nm). Vzorek byl ozařován po dobu 3 hodin.



Obr. 48: CMC netkaná textilie s nanočásticemi stříbra

Vzorek č. 2

Druhý vzorek je opět z netkané textilie neutrálního charakteru (plošná hmotnost $60 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$, DS 0,345, pH 6,6), která byla zlyofilizována za účelem dosažení mikroporézní hřejivé struktury.

Optimální podmínky lyofilizace:

mražení – 4 hodiny

vakuum – 18 hodin (1,000 mbar)

ohřev políc – 1 hodina (0,500 mbar)



Obr. 49: CMC netkaná textilie po lyofilizaci

Vzorek č. 3

Třetí vzorek je film vyrobený z roztoku sodné soli karboxymethylcelulózy (Na^+CMC , DS 0,7) o koncentraci $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Roztok byl sušen v silikonové formě při pokojové teplotě po dobu 7 dní. Takto připravený film byl následně plazmaticky upraven. Vzorek byl plazmatu vystaven po dobu 90 s.

Nastavení komory:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| • Tlak | 13 [Pa] |
| • Výkon zdroje/výkon zpětného odrazu | 26 [W/0] |
| • Napětí | 250 [V] |
| • Průtok plynu (kyslíku) | 15 [$\text{cm}^3\cdot\text{m}^{-1}$] |



Obr. 50: Oplazmovaný CMC film

Vzorek č. 4

Pro přípravu vzorku byl využit roztok čisté CMC o koncentraci $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDGE) a dále 10% roztok persíranu draselného ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). Do 20 ml roztoku CMC bylo přidáno 0,06 g BDDGE a 2 ml 10 % $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Roztok se všemi komponenty byl dobře rozmíchán a vlit do silikonové formy. Takto připravený vzorek byl umístěn do horkovzdušné sušárny nastavené na reakční teplotu 80°C po dobu 8 hodin.



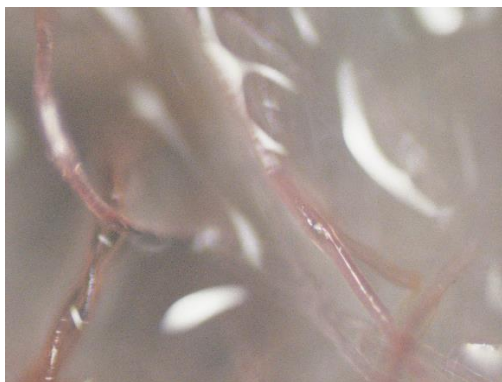
Obr. 51: CMC roztok zesíťovaný pomocí BDDGE s následným sušením

4.6.1 Struktura povrchu testovaných materiálů

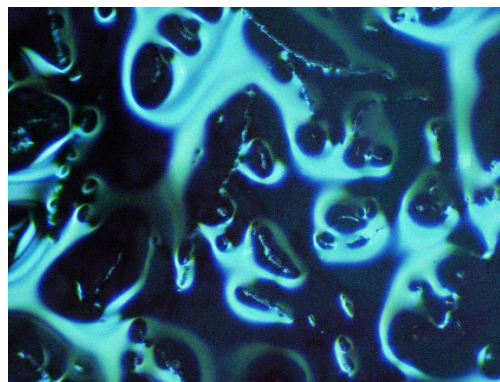
Pomocí optického mikroskopu a E-SEM byly snímány povrchy testovaných vzorků. Všechny testované vzorky byly předem namočeny v růstovém médium s bakteriemi či buňkami (optická mikroskopie – E. coli, E-SEM – fibroblasty). Sledován byl vliv médií na testované vzorky, popř. výskyt bakterií či buněk.

4.6.1.1 Optický mikroskop

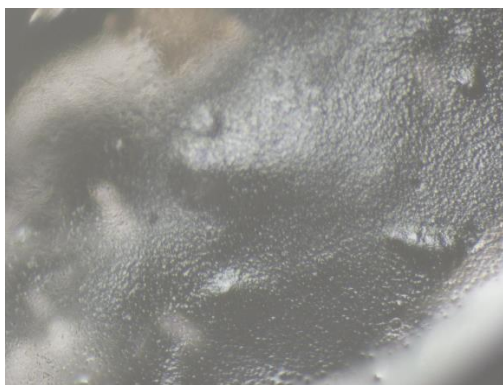
Testované vzorky (2·1 cm) byly ponořeny do růstového bakteriálního média s 1 ml (620 nm) bakterií E. coli, poté byly ponechány v inkubátoru po dobu 24 hodin. Použitým optickým mikroskopem byl Olympus IX 70, software pro zpracování Stream Essentials.



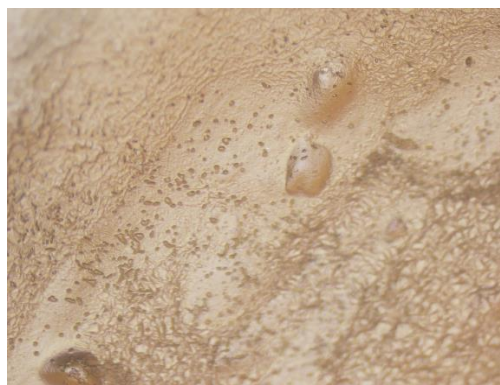
Obr. 52: Vzorek č. 1



Obr. 53: Vzorek č. 2



Obr. 54: Vzorek č. 3

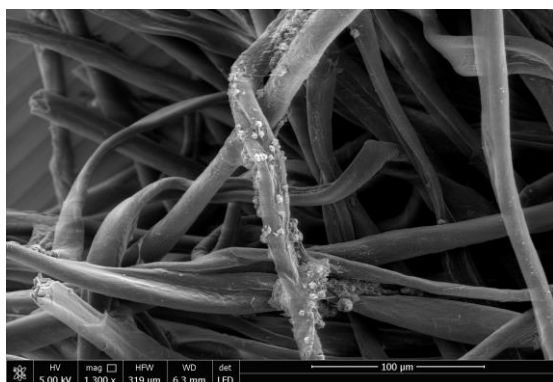


Obr. 55: Vzorek č. 4

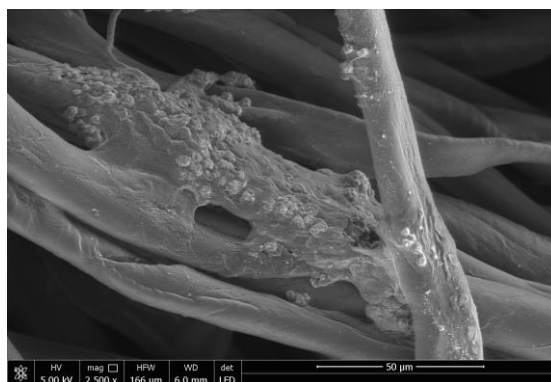
Testované vlákenné vzorky (č. 1 a 2) v růstovém médiu mírně nabobtnaly. Testované vzorky v podobě filmu (č. 3 a 4) v médiu mírně zgelovatěly. K výrazným změnám ve struktuře ovšem nedošlo.

4.6.1.2 E-SEM

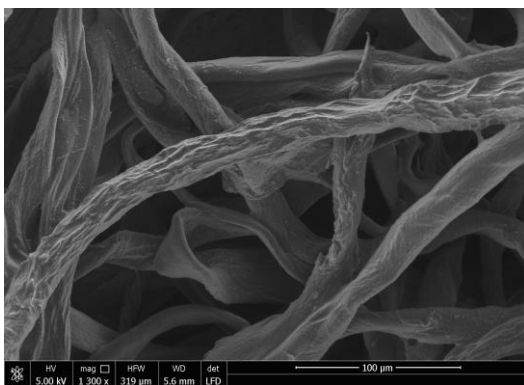
Na snímku (Obr. 56, Obr. 57) vzorku č. 1 je patrná přítomnost agregátů nanočástic stříbra. Růstové médium jak pro buňky, tak i pro bakterie podporuje tvorbu agregátů nanočástic. U vzorku č. 2 (Obr. 58, Obr. 59) došlo po ponoření do růstového média k nabobtnání vláken. Ani u jednoho z těchto dvou vzorků se nepodařilo na vzorcích najít buňky. Na vzorcích č. 3 a 4 (Obr. 60 až Obr. 63) se buňky pomocí envirometální SEM analýzy podařilo nasnímat.



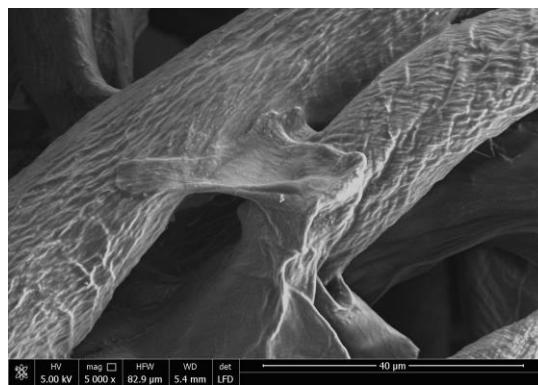
Obr. 56: Vzorek č. 1 - 1300x



Obr. 57: Vzorek č. 1 - 5000x



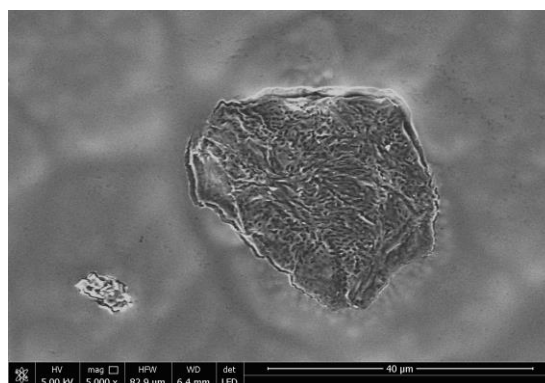
Obr. 58: Vzorek č. 2 - 1300x



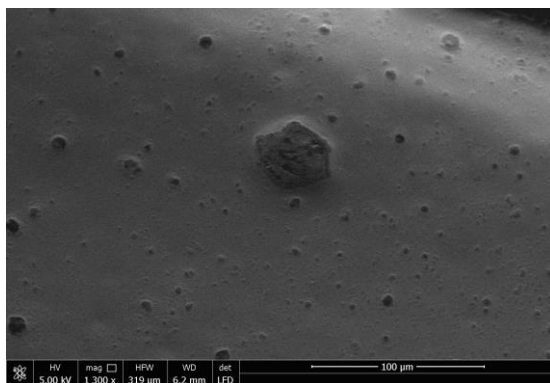
Obr. 59: Vzorek č. 2 - 5000x



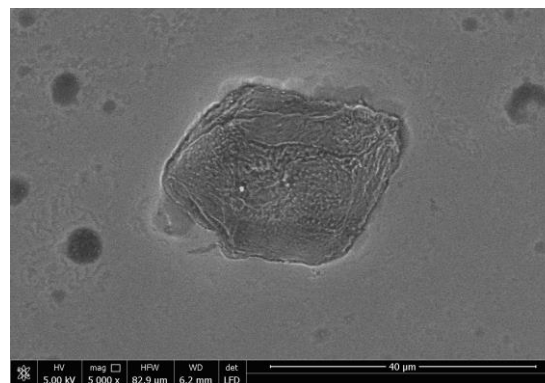
Obr. 60: Vzorek č. 3 - 1300x



Obr. 61: Vzorek č. 3 - 5000x



Obr. 62: Vzorek č. 4 - 1300x



Obr. 63: Vzorek č. 4 - 5000x

Velikost fibroblastů v nataženém stavu je cca 150 µm, po zmrazení se buňka “smrskne” a velikost se zmenší na přibližně 1/3.

4.6.2 Tvorba bakteriálního biofilmu

Tvorba bakteriálních biofilmů probíhala na předem připravených polymerních vzorcích s následným testováním pomocí fluorescenčního mikroskopu. Prvním krokem byla příprava média a rozředění bakterií *E. coli* v předem stanovené koncentraci.

4.6.2.1 Koncentrace bakterií E. Coli v bakteriálním roztoku

Koncentrace bakterií se měřila pomocí měření absorbance s využitím spektrofotometru Pharmacia Biotech Ultrospec 2000. Do 200 ml růstového média se přidává 1 ml bakterií při vlnové délce 620 nm (absorbance 1 při 620 nm). Do spektrofotometru se vložila 1 kyveta s destilovanou vodou a 1 kyveta s roztokem bakterií. Pomocí destilované vody se provedla kalibrace přístroje. Během experimentu byly provedeny 3 opakování tvorby a testování bakteriálního biofilmu. Výpočet množství bakterií je zobrazen v Tab. 20.

Tab. 20: Výpočet množství bakterií

Pokus	Naměřená absorbance	Použité množství bakterií [ml]
1.	1,738	0,57
2.	1,290	0,78
3.	2,700	0,37

4.6.2.2 Kontrolní vzorek

Kontrolními vzorky pro testování tvorby bakteriálního biofilmu byly plíšky z austenitické oceli ČSN 17349 viz Obr. 64 a Obr. 65.



Obr. 64: Kontrolní vzorky



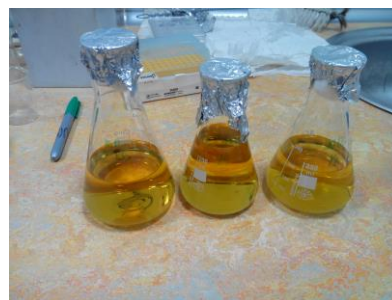
Obr. 65: Povrch kontrolního vzorku

4.6.2.3 Tvorba bakteriálního biofilmu

Připravené polymerní vzorky byly sterilizovány pomocí ethanolu. Testované vzorky byly poté ve sterilních podmínkách (zajištěno plamenem) umístěny do baňky s médiem (Obr. 67), do kterého bylo přidán roztok s bakteriemi (Obr. 66). Médium bylo posléze vloženo do termického inkubátoru nastaveného na 37 °C, kde se roztok se vzorky ponechal po dobu 24 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly vzorky vyjmuty.



Obr. 66: Roztok s bakteriemi *E. coli*



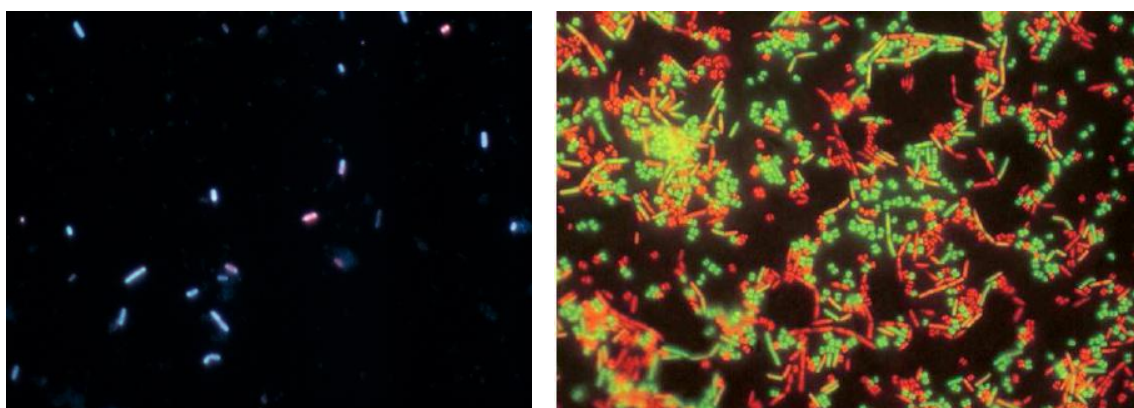
Obr. 67: Růstová média pro bakterie

4.6.2.4 Testování

Vzorky byly před nanesením barviva smočeny ve fyziologickém roztoku (možno použít pufr). Na vzorky se přidala speciální barviva. Během experimentu byla použita dvojice různá barviva z důvodu silné fluorescence vzorků. Barviva se liší schopností pronikat do neporušených buněk. Po vazbě na nukleové kyseliny (NK) u nich dochází k posunu a zesílení intenzity emitované fluorescence.

- 1) (bis-benzimide) pentahydrate + propidium iodide
- 2) Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit

Barviva bylo nutné ponechat na vzorcích po dobu 2 minut, poté byly odstraněny ofouknutím. Poté bylo provedeno snímání povrchu vzorků pomocí fluorescenčního mikroskopu, viz Obr. 68.



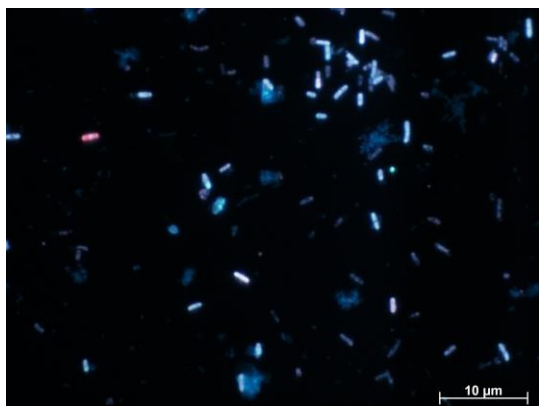
Obr. 68: Příklad fluorescenčního značení mrtvých a živých buněk, zvětšení 500x

4.6.2.5 Výsledky

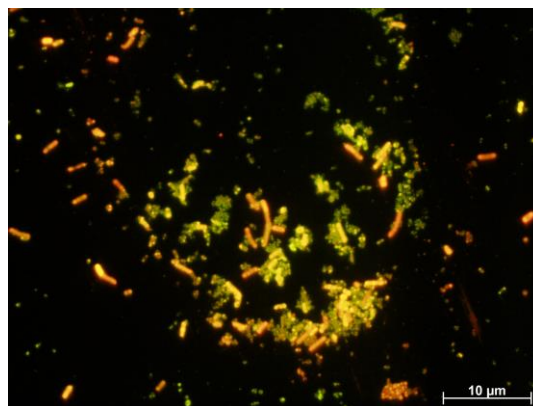
Snímky nebylo možné dále zpracovat počítáním bakterií. U většiny vzorků nebylo možné zobrazení bakterií v dostatečném zvětšení nutném pro počítání. Pro počítání je nutné zvětšení 500x. Od použití (bis-benzimidide) pentahydrate + Propidium Iodide se po prvním testu upustilo. Fluorescence samotných vzorků neumožnila těmito

„značkovadly“ nic vidět. Z tohoto důvodu byly testované vzorky dále značkovány pouze pomocí Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit.

Kontrolní vzorek



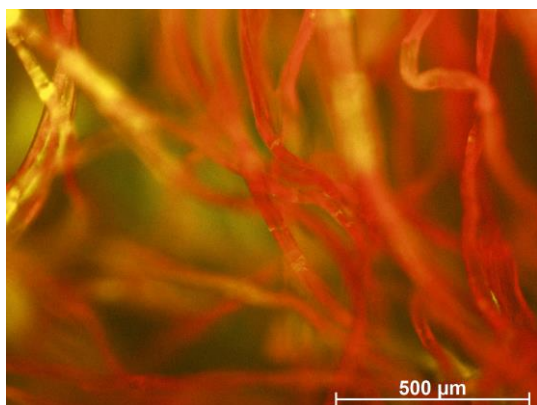
Obr. 69: (bis-benzimidazole) pentahydrate + Propidium Iodide



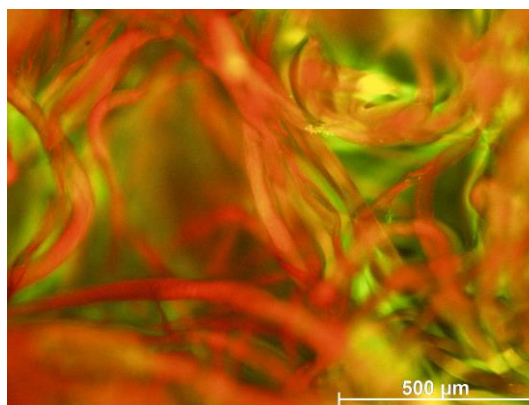
Obr. 70: Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit

Oba dva způsoby barvení šlo využít jen v případě kontrolních vzorků. Na Obr. 69 a Obr. 70 lze vidět jak živé, tak i mrtvé bakterie. Austenitická ocel nemá antibakteriální vlastnosti, proto je zřejmý vyšší výskyt živých bakterií. Oba dva snímky jsou pořízeny ve zvětšení 500x. V případě testovaných vzorků bylo možné ve většině případů použít pouze zvětšení 100x.

Vzorek č. 1



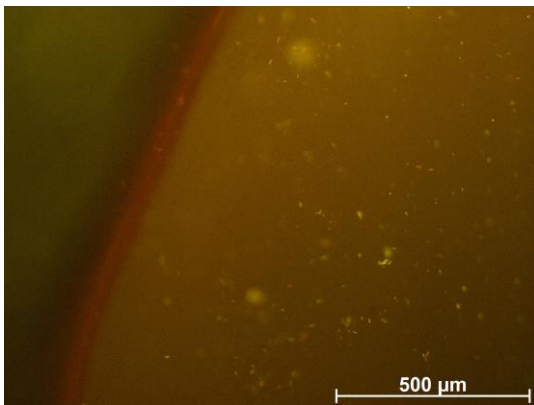
Obr. 71: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO₃ 1 g·l⁻¹



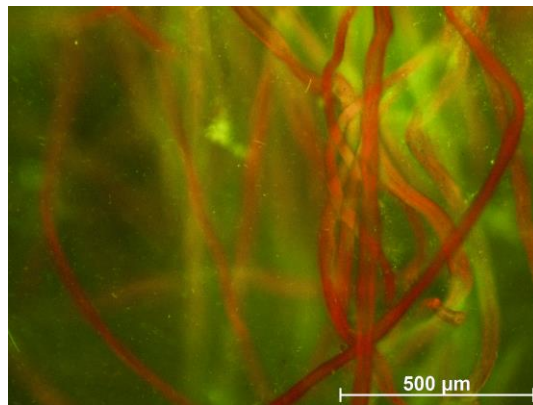
Obr. 72: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO₃ 1 g·l⁻¹

Na Obr. 71 jsou viditelné dvě malé kolonie bakterií. I na Obr. 72 je patrná jedna kolonie bakterií.

Na Obr. 73 jsou nafoceny bakterie mimo vlákna vzorku č. 1. Ze snímku lze vidět, že bakterie jsou mimo vzorek a na samotném vzorku se vyskytují ojediněle.



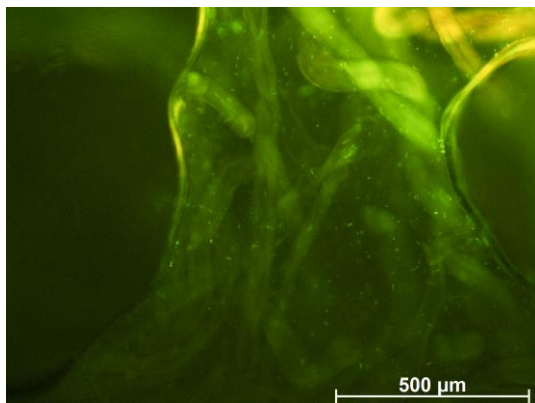
Obr. 73: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO_3 $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$



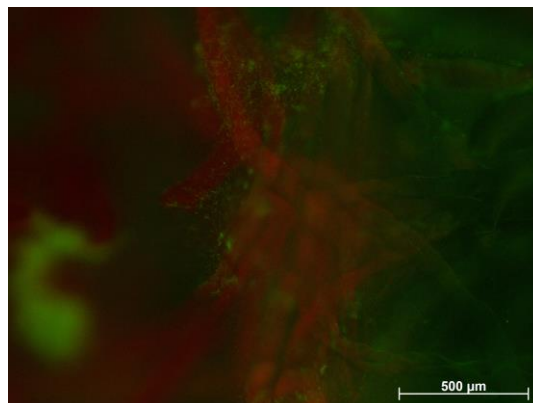
Obr. 74: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO_3 $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

Na Obr. 74 je snímek vzorku č. 1, který byl smočen v roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ze snímku je patrná přítomnost bakterií v okolí vláken, ale nikoli na vlákních. Stejně tomu bylo i u vzorku, který byl smočen v roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

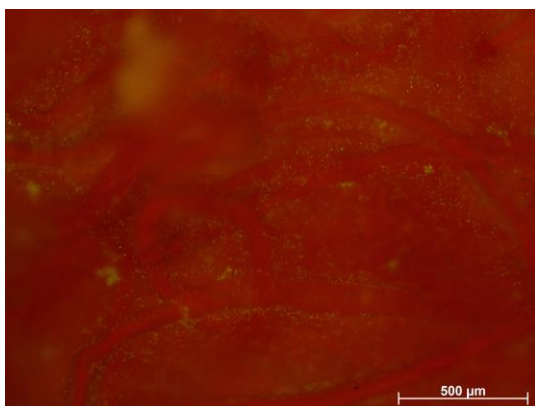
Vzorek č. 2



Obr. 75: Vzorek č. 2



Obr. 76: Vzorek č. 2



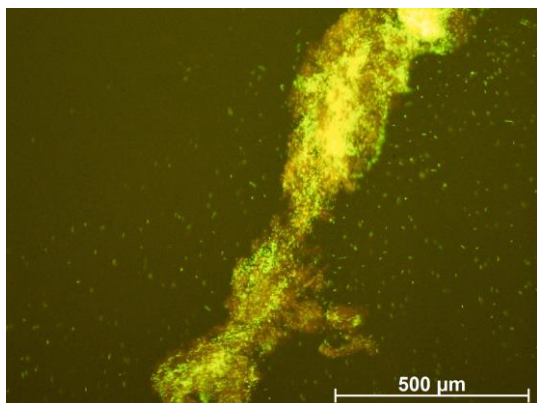
Obr. 77: Vzorek č. 2



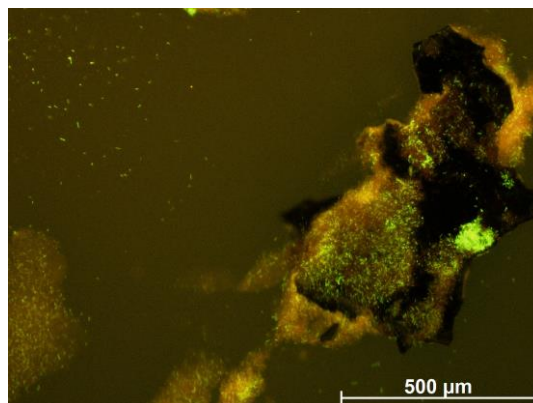
Obr. 78: Vzorek č. 2

Na Obr. 75, Obr. 76 a Obr. 77 je zřejmá přítomnost většího počtu bakterií, především živých. Bakterie se v tomto případě nevyskytují pouze v okolí vláken, ale i na vláknech. Na Obr. 78 je vyobrazena přítomnost bakterií na povrchu vláken bez použití fluorescence.

Vzorek č. 3

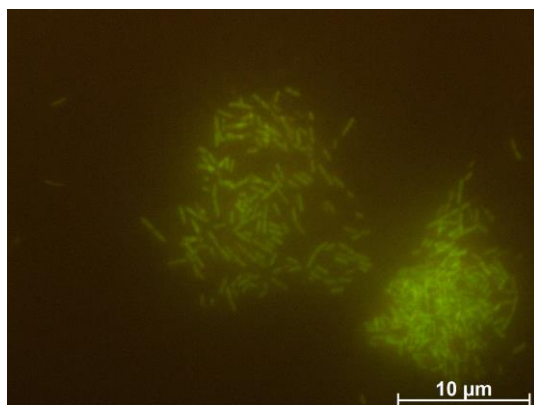


Obr. 79: Vzorek č. 3



Obr. 80: Vzorek č. 3

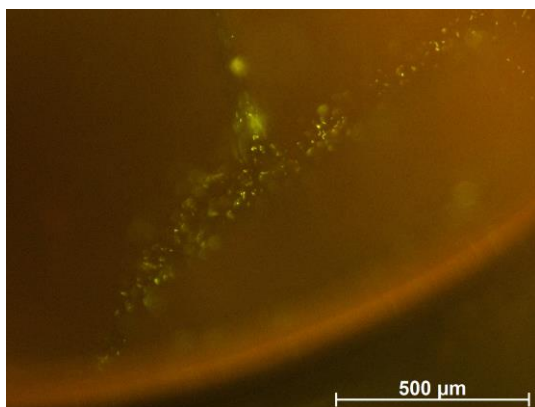
Na Obr. 79 a Obr. 80 je zřejmý vysoký výskyt bakterií, a to nejen v okolí vzorku, ale i na povrchu vzorku. I u tohoto vzorku se vyskytují převážně živé bakterie.



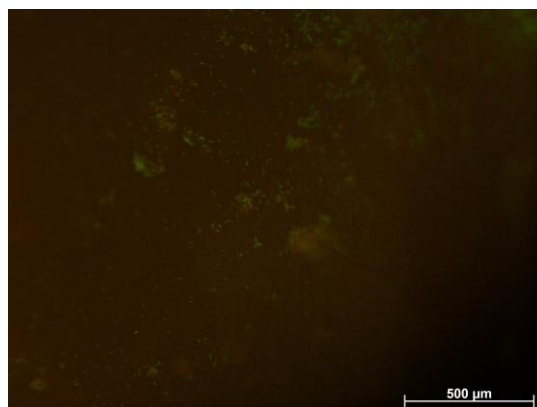
Obr. 81: Vzorek č. 3, zvětšení 500 x

Na tomto případě bylo možné bakterie zobrazit i při zvětšení 500x, ovšem při zhoršeném zaostření. Proto se počítání nedalo provést. Na snímku jsou pouze živé bakterie.

Vzorek č. 4



Obr. 82: Vzorek č. 4



Obr. 83: Vzorek č. 4

Na Obr. 82 a Obr. 83 je patrný výskyt bakterií, jak živých, tak i mrtvých. Výskyt bakterií je nižší než u předchozího vzorku.

Mrtvé bakterie se podařilo vyobrazit pouze na vzorku č. 1 a 4. Na ostatních vzorcích se vyskytují pouze bakterie živé. Z tohoto důvodu se dá usuzovat, že vzorky č. 1 a 4 mají antibakteriální účinek, který nebylo ovšem možno kvantifikovat.

Z tohoto důvodu byl proveden experiment, který umožnil porovnat antibakteriální účinek jednotlivých vzorků s využitím měření respirace bakterií.

4.6.3 Test biocidity/biodegradability

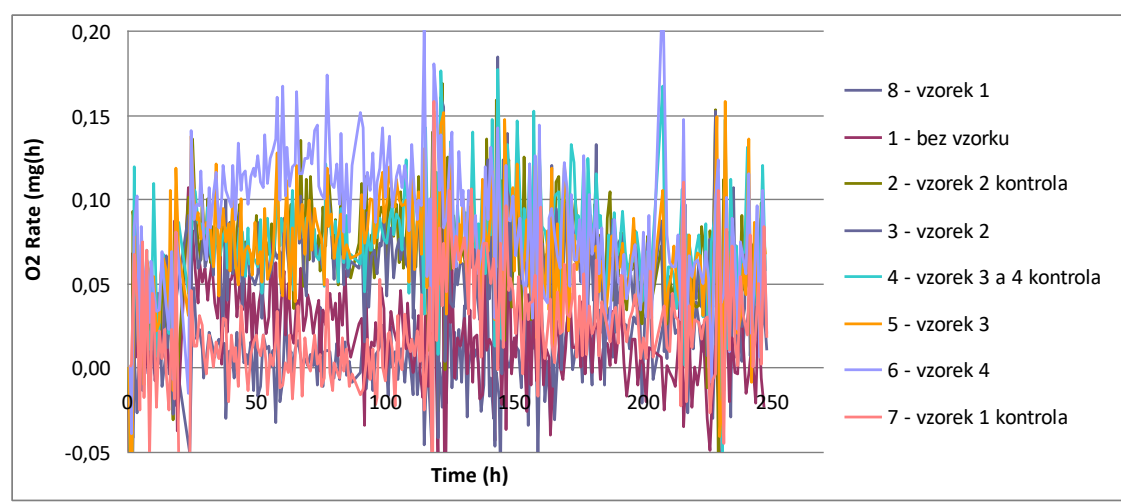
Existuje mnoho obecných pravidel pro určení biodegradace organických látek z jejich struktury např. čím vyšší molekulová hmotnost, tím hůř je látka degradována, látky ve vodě dobře rozpustné se snadněji degradují než látky ve vodě nerozpustné, látky s vyšším počtem benzenových jader snižují biodegradaci, heterocyklické sloučeniny se sírou jsou hůře degradovatelné než jejich analogy bez přítomnosti síry, čím více substituentů molekula obsahuje, tím hůře podléhá biodegradaci. Údaje komor jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: Údaje komor (Ch)

Ch	Restriction	Leakage	Volume	Normalization	Ch_Temp	Comment	Váha vzorků	Pozn.
	[mmhg]	[ml·min ⁻¹]	[ml]	N.A.	[°C]		[g]	rozpustnost
1	0	-0,11	279	1	Auto*	1 - Bez vzorku	0,0000	ANO
2	1	-0,096	282	1	Auto*	2 - vzorek 2 kontrola	0,3331	ANO
3	0	-0,064	285	1	Auto*	3 - vzorek 2	0,3310	ANO
4	0	-0,042	285	1	Auto*	4 - vzorek 3 kontrola	0,3327	ANO
5	0	-0,058	282	1	Auto*	5 - vzorek 3	0,3334	ANO
6	0	-0,087	279	1	Auto*	6 - vzorek 4	0,3212	ANO
7	0	-0,066	280	1	Auto*	7 - vzorek 1 kontrola	0,3335	NE
8	0	-0,053	281	1	Auto*	8 - vzorek 1	0,3317	NE

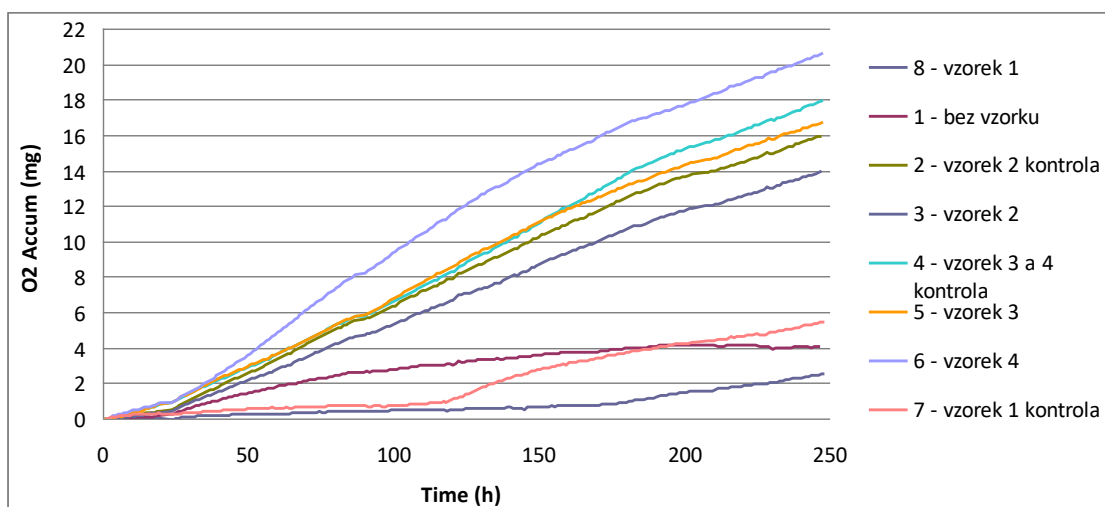
*Teplota komor byla v rozmezí 19 - 23 °C

Respirogram udává rychlost (resp. změnu rychlosti) bakteriálního metabolismu v důsledku daného prostředí, kde se vzorek vyskytuje.



Graf 28: Okamžitá spotřeba kyslíku

Křivky v Graf 28 jsou standardně mnohem hladší, „roztřesení“ křivek je patrně způsobeno nižší použitou koncentrací bakterií (obvykle je i 10x vyšší).

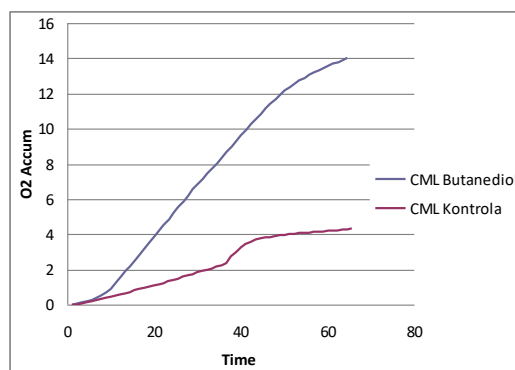
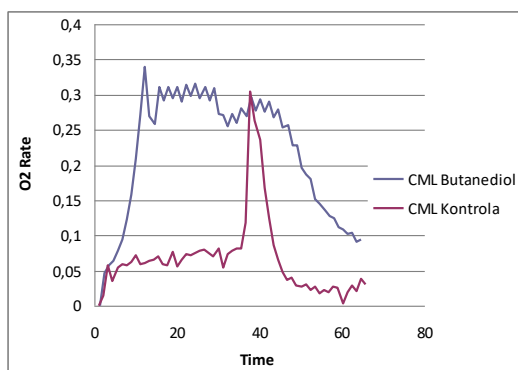


Graf 29: Kumulativní spotřeba kyslíku

Nejnižší respirace byla pozorována u vzorku č. 1 – vzorek obsahující stříbro. Zvýšená respirace u daného vzorku nastala až v čase cca. 170, do této doby lze vzorek považovat za zcela „antibakteriální“, degradace nosiče nenastává. Po čase 170 hodin dochází k pozvolnému nárůstu počtu bakterií, tj. respirace se mírně zvyšuje. Přítomnost nanočástic v případě vzorku č. 1 snižuje respirační aktivitu bakterií oproti kontrole (Graf 29). Tento výsledek koresponduje s výsledky předchozího měření tvorby bakteriálního biofilmu.

Z grafů (Graf 30, Graf 31) je vidět, že nejvyšší respirační aktivitu měl vzorek č. 4 – tj. bakterie přítomné v suspenzi, kde byl i tento vzorek mají „nejrychlejší metabolismus“, tj. nejvyšší spotřebu kyslíku a produkci oxidu uhličitého, tj. dané prostředí nemá žádné toxické účinky, a naopak množení a bakteriální metabolismus podporuje.

Vzorek č. 4 se v roztoku BSM rozpustil již po jedné hodině (v předchozích experimentech se v médiích rozpouštěl až po 24 hodinách), což patrně zapříčinilo, že vzorek nepůsobil zcela správně. Výsledky tohoto vzorku jsou překvapivé, vzorek je totiž toxický pro lidské kožní buňky, rovněž u tohoto vzorku byla patrná přítomnost mrtvých bakterií. Experiment s tímto vzorkem byl zopakován, ale testován byl pouze po dobu 70 hodin. Výsledky experimentu byly shodné s předchozími.



Graf 30: Kumulativní spotřeba kyslíku (vzorek č. 4) Graf 31: Okamžitá spotřeba kyslíku (vzorek č. 4)

4.6.4 Testování cytotoxicity

Live/Dead

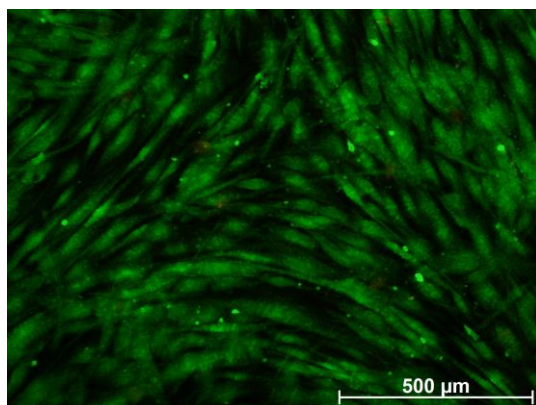
Použitými vitálními barvivami v tomto experimentu byly Calcein AM pro živé buňky (zelená fluorescence – indikuje intracelulární esterázovou aktivitu) a Ethidium bromide pro mrtvé buňky (červená fluorescence – indikuje ztrátu integrity plasmatické membrány).

- Do 10 ml PBS se přidalo 5 μ l Ethidinu a 0,94 μ l Calceinu.

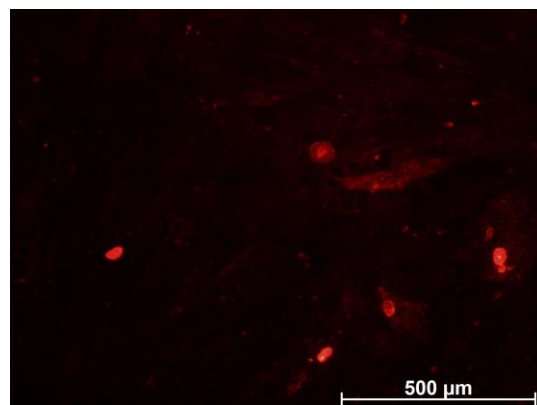
Plát s jamkami se vzorky a vyšetými buňkami se umístil do inkubátoru po dobu 48 hodin. Vzorky se poté 2x opláchly pomocí PBS, poté se na vzorky aplikoval barvicí roztok (2 ml do každé jamky) a vzorek se umístil na 45 minut do tmy. Poté se vzorky opět propláchly 2x pufrům. Poté se již vzorky zkoumali pomocí fluorescenčního mikroskopu za použití filtru 4 a 5.

Test Live/Dead byl během experimentu na testovaných vzorcích proveden 3x. Testování touto metodou opět nebylo zcela jednoduché díky silné fluorescenci samotných vzorků. Z důvodu silné fluorescence nebylo možné pořídit dostatek snímků mrtvých buněk k počítání. Proto ani v tomto experimentu nebylo počítání provedeno a životnost buněk se posuzovala pouze vizuálně.

Kontrolní vzorek



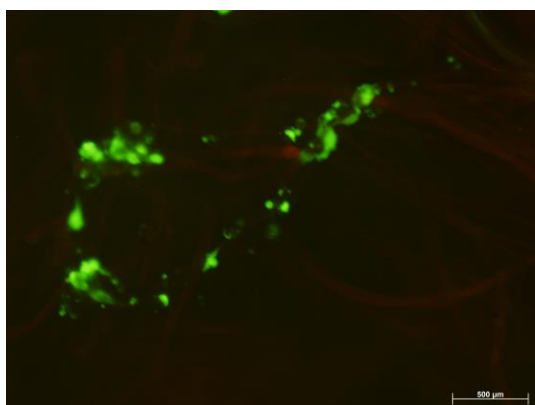
Obr. 84: Kontrolní vzorek – živé buňky



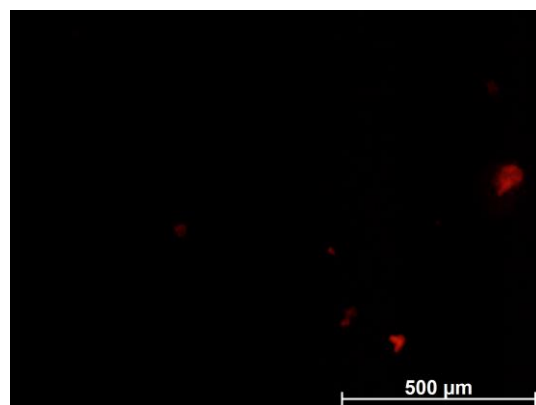
Obr. 85: Kontrolní vzorek – mrtvé buňky

Z výše uvedených obrázků (Obr. 84, Obr. 85) je zřejmé, že fibroblasty dobře udržují zelený Calcein v cytoplazmě a vykazují normální morfologii. Z důvodu zájmu o to, zda jsou buňky života schopny i v okolí vzorků byly snímány i jamky pod vzorky.

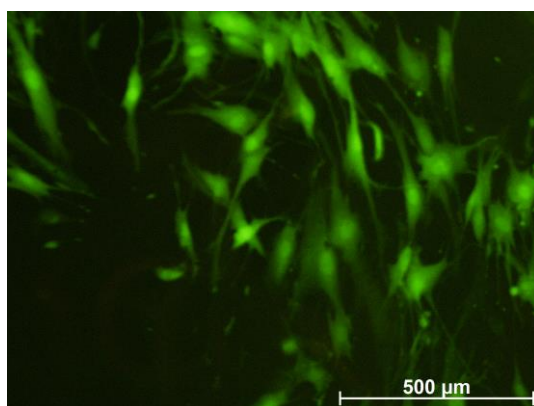
Vzorek č. 1



Obr. 86: Vzorek č. 1 – živé buňky



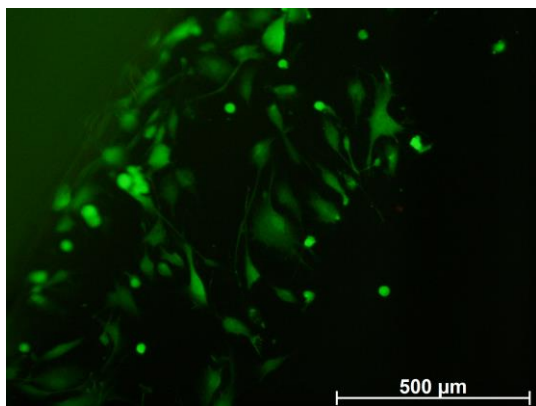
Obr. 87: Vzorek č. 1 – mrtvé buňky



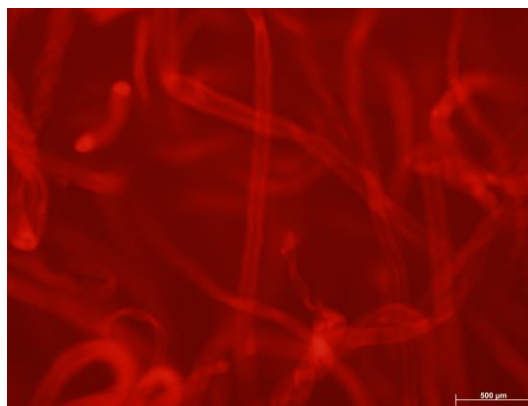
Obr. 88: Vzorek č. 1 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Na vzorku č. 1 (Obr. 86, Obr. 87 a Obr. 88) je malé množství živých buněk. Mrtvé buňky jsou špatně zobrazitelné díky fluorescenci samotného vzorku. V okolí vzorku jsou přítomny živé buňky, ačkoli je vzorek ovlivňuje.

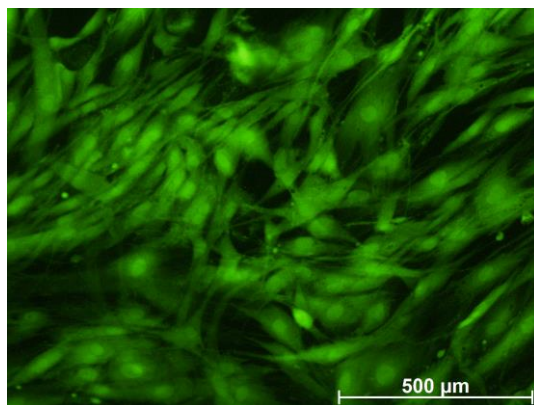
Vzorek č. 2



Obr. 89: Vzorek č. 2 – živé buňky



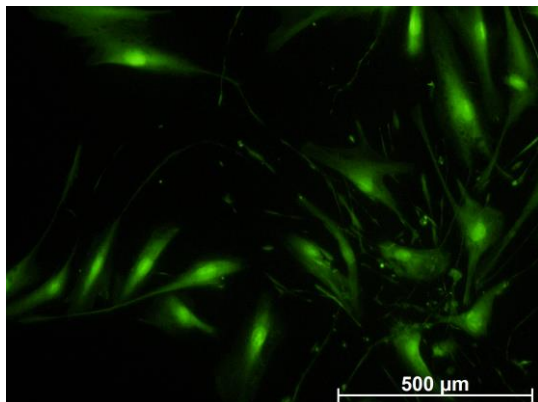
Obr. 90: Vzorek č. 2 – mrtvé buňky



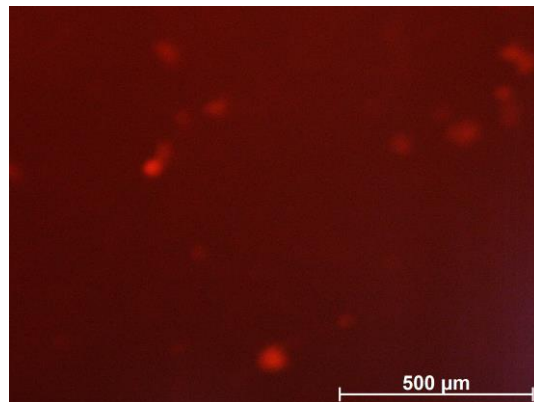
Obr. 91: Vzorek č. 2 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Ze snímků vzorků č. 2 (Obr. 89, Obr. 90 a Obr. 91) je patrný vyšší výskyt živých buněk jak na samotném vzorku, tak i v jeho okolí. Nebyla nalezena žádná mrtvá buňka.

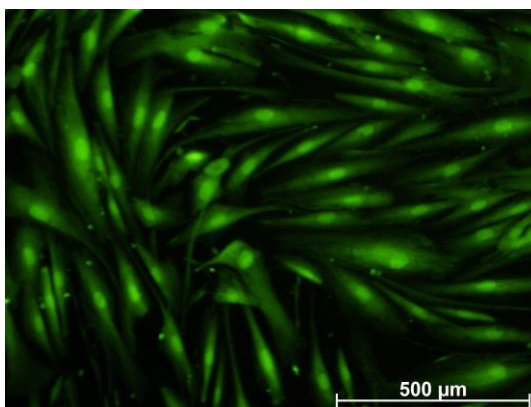
Vzorek č. 3



Obr. 92: Vzorek č. 3 – živé buňky



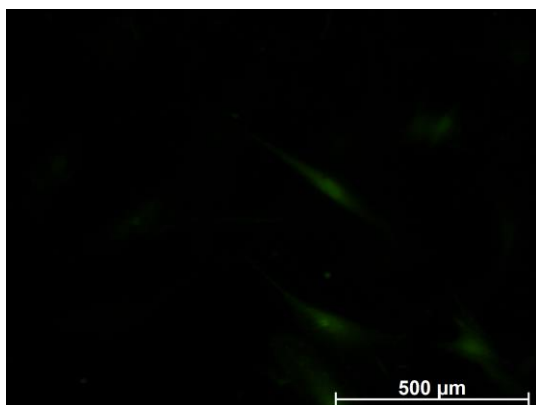
Obr. 93: Vzorek č. 3 – mrtvé buňky



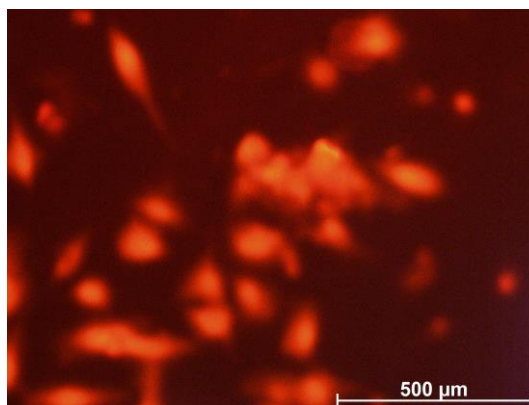
Obr. 94: Vzorek č. 3 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Na vzorku č. 3 (Obr. 92, Obr. 93 a Obr. 94) se vyskytují živé i mrtvé buňky. Živé buňky fibroblastů mají značnou převahu nad mrtvými. Vzorek výrazným způsobem neovlivňuje životaschopnost buněk v okolí vzorku.

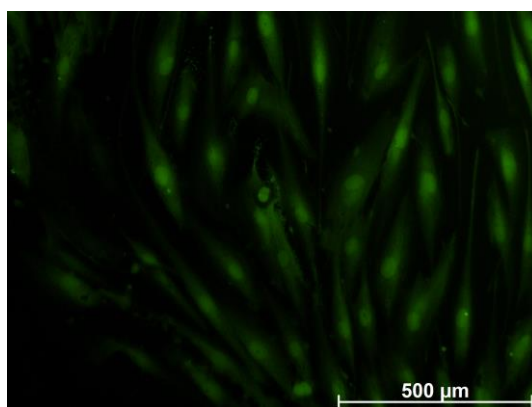
Vzorek č. 4



Obr. 95: Vzorek č. 4 – živé buňky



Obr. 96: Vzorek č. 4 – mrtvé buňky



Obr. 97: Vzorek č. 4 – živé buňky, jamka pod vzorkem

Na vzorku č. 4 (Obr. 95, Obr. 96 a Obr. 97) se opět vyskytují živé i mrtvé buňky. Mrtvé buňky fibroblastů mají v tomto případě značnou převahu nad živými. Vzorek ovlivňuje životnost buněk v okolí vzorku, ale i přesto jsou buňky schopny přežít.

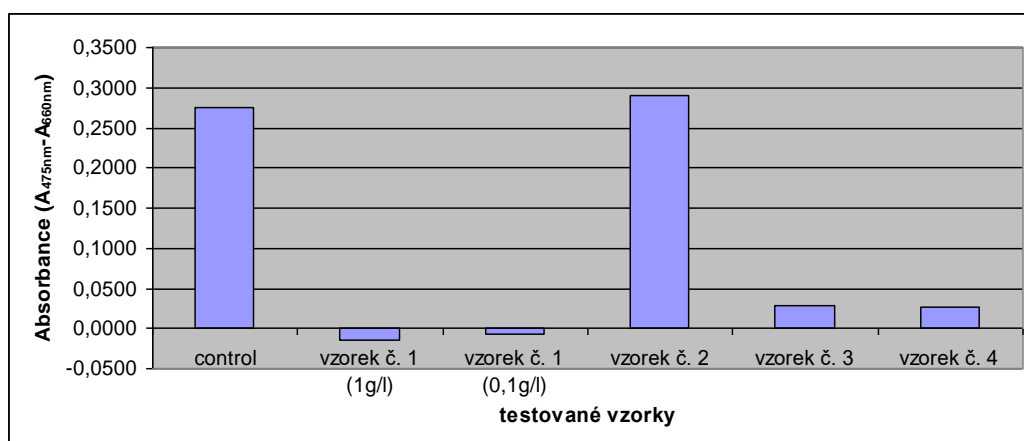
XTT

Tento experimentů byl 5x zopakován. Pro všechny provedené testy byl reakční čas v inkubátoru 3 hodiny a 40 minut. Následně byla měřena absorbance jednotlivých jamek za použití filtru pro specifickou absorbanci 475 nm a filtru pro nespecifickou absorbanci 660 nm. Výsledky neměřené specifické absorbance jsou uvedeny v Tab. 22.

Vyšší naměřená hodnota absorbance znamená vyšší množství živých buněk.

Tab. 22: Specifická absorbance

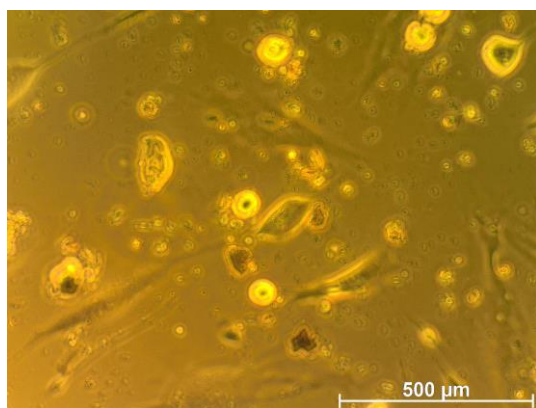
Absorbance ($A_{475nm} - A_{660nm}$)					
kontrola	vzorek č. 1 ($1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	vzorek č. 1 ($0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$)	vzorek č. 2	vzorek č. 3	vzorek č. 4
0,2754	-0,0144	-0,0077	0,2911	0,0277	0,0275



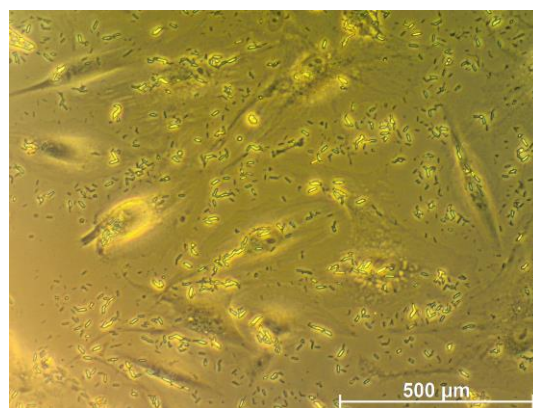
Graf 32: Výsledky XTT

Z výsledků XTT testu (Graf 32) vyplývá, že vzorek č. 1 (obě koncentrace použitého dusičnanu stříbrného) je pro buňky fibroblastů silně toxický. Výsledky vzorky č. 2 jsou lepší než naměřené výsledky u kontrolního vzorku. Naměřená absorbance je u vzorku č. 3 a 4 téměř shodná. Oba tyto vzorky jsou pro buňky fibroblastů toxické, ale i přesto zhruba desetina buněk přežila v porovnání s kontrolním vzorkem.

Měření cytotoxicity jasně poukazuje na fakt, že vzorek č. 2 je vhodný pro růst a proliferaci buněk.



Obr. 98: Kontrolní vzorek po reakci XTT kitu



Obr. 99: Vzorek č. 3 po reakci XTT kitu

Na Obr. 98 lze vidět buňky fibroblastů po reakci s XTT kitem, kde skvrny v okolí buněk reprezentují právě tento kit. Na Obr. 99 lze vidět i části materiálu z extraktu.

4.7 Sorpce iontů kovů

Tyto experimenty byly do práce zahrnuty s ohledem na dílčí cíl práce: navrhnout mimomedicínskou aplikaci CMC.

4.7.1 Základní experiment

Bylo připraveno 12 roztoků s různými ionty kovů o koncentraci $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Do každé z 12-ti testovacích trubiček bylo vloženo 0,1 g sodné soli karboxymethylcelulózy v práškové formě (DS 0,9) a 10 ml z jednotlivých roztoků iontů kovů. Takto připravené vzorky se nechaly odležet 24 hodin a poté byly zkoumány viditelné změny po přidání CMC. Popis změn je uveden v Tab. 23, červeně označené vzorky byly podrobeny dalším experimentům.

Tab. 23: Změny vzhledu po 24 hodinách

Vzorec směsi	Název iontu kovu	Vzhled roztoku po 24 hodinách
H ₂ O	žádný	žádná změna, roztok je transparentní, gel je na dně
K ₂ Cr ₂ O ₇	Cr ³⁺	žádná změna, roztok s gelem zežloutl
Sr(NO ₃) ₂	Sr ²⁺	žádná změna, roztok je s gelem transparentní
AgNO ₃	Ag ⁺	žádná změna, roztok je s gelem transparentní
PbC ₄ H ₆ O ₄ ·3H ₂ O	Pb ²⁺	zajímavé chování, roztok je stále transparentní, ale gel na dně získal spíše mléčné zbarvení, emulze je rozptýlena po trubici
NiSO ₄	Ni ²⁺	žádná změna, roztok je s gelem transparentní
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Cu ²⁺	zajímavé chování, roztok je namodralý, gel na dně získal také namodralý odstín a emulze je rozptýlena po trubici
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	Fe ²⁺	žádná změna, roztok s gelem velmi zežloutl
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Fe ³⁺	Pravděpodobně reakce na dně trubice, hnědě zbarvený gel na dně a žlutě zbarvený nad dnem trubice
SnCl ₂	Sn ²⁺	zajímavé chování, velké množství mléčně zbarvené gelové emulze, která je rozptýlena po trubici
Ba(NO ₃) ₂	Ba ²⁺	žádná změna, roztok je transparentní, gel je na dně
CdI ₂	Cd ²⁺	žádná změna, roztok je transparentní, gel je na dně

4.7.2 Reakce povrstvené polyesterové tkaniny a iontů kovů

Vzorky byly připraveny rozmícháním roztoku CMC (DS 0,7) dle kapitoly 3.2, roztok byl poté aplikován na polyesterovou doprovodnou tkaninu. Takto připravené vzorky byly vysušeny a termicky síťovány.

Suché zesíťené vzorky byly umístěny do baňky o objemu 1 litr, které bylo možné uzavřít. Do každé baňky byl nalit 1 litr destilované vody a vypočítané množství soli kovových iontů. Množství soli kovových iontů bylo vypočteno z molární hmotnosti každé soli. Bylo provedeno měření pH každého roztoku pH metrem a rovněž byla provedena optická emisní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP OES).

Tab. 24: obsah kovu v 1 gramu sloučeniny

Sůl s obsahem kovových iontů	Molární hmotnost [g·mol ⁻¹]	Obsah kovu v 1 gramu sloučeniny [g]	Použitá koncentrace solí s obsahem kov. iontů [g·l ⁻¹]
Sn (SnCl ₂) · 2H ₂ O	226	0,52526	0,16724
Cu (CuSO ₄) · 5H ₂ O	250	0,25418	0,18500
Pb (PbC ₄ H ₆ O ₄) · 3H ₂ O	379	0,54621	0,28046

- Použité koncentrace solí kovových iontů [g·l⁻¹] - N kovu·molární hmotnost solí kovových iontů.
- N COOH je vypočteno z [celkové molekulové hmotnosti jedné COOH skupiny·počet COOH skupin (stanoveno z DS CMC)] / MW CMC
- N kovu pak bylo stanoveno jako dvojnásobek N COOH, zamýšleno bylo pracovat s přebytkem viz Tab. 25.

Tab. 25: Stanovení N kovu

m CMC [g]	N COOH	N kovu
1	0,00037	0,00074

Na základě provedení prvního experimentu bylo 10x poníženo množství použitého CMC z důvodu, že po úvodním experimentu nebyly měřitelné výsledky zbytkového množství solí kovových iontů, z čehož vyplynulo, že je CMC lepší sorbent kovových iontů než byl předpoklad.

Tab. 26: Průběh experimentu sorpce iontů kovů pomocí CMC síťované při různých teplotách

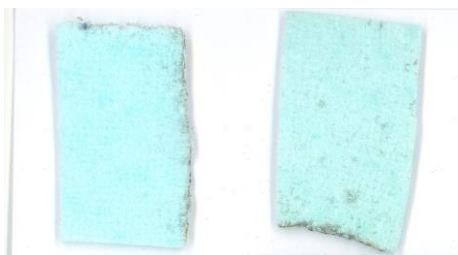
Ionty kovů - teplota síťování CMC	Váha CMC [g] před	Váha CMC [g] po	Dávka soli [g]	pH roztoku	Zbylé množství soli v roztoku po reakci [g]	Zbylé množství kovu v roztoku po reakci [g]
Pb - 160 °C	0,1524	0,1411	0,4274	5,55	0,3124	0,1706
Pb - 170 °C	0,1411	0,1401	0,3957	5,49	0,2651	0,1448
Pb - 180 °C	0,1433	0,1411	0,4019	5,52	0,2775	0,1516
Pb - 190 °C	0,2121	0,1832	0,5949	5,51	0,3526	0,1926
Pb - 200 °C	0,1631	0,1528	0,4574	5,25	0,3058	0,1670
Pb - 210 °C	0,1908	0,1725	0,5351	5,53	0,3564	0,1947

CMC nanesená na textilním nosiči v průměru absorbovala 33,5 % olova. Dávka soli octanu olovnatého trihydrátu v průměru obsahovala 0,25600 g olova.

Tab. 27: Průběh experimentu sorpce iontů kovů pomocí CMC síťované při různých teplotách

Ionty kovů - teplota síťování CMC	Váha CMC [g] před	Váha CMC [g] po	Dávka soli [g]	pH roztoku	Zbylé množství soli v roztoku po reakci [g]	Zbylé množství kovu v roztoku po reakci [g]
Cu - 160 °C	0,1432	0,1321	0,2649	5,01	0,1051	0,0267
Cu - 170 °C	0,1602	0,1238	0,2964	5,01	0,1488	0,0378
Cu - 180 °C	0,1429	0,1405	0,2644	5,41	0,0979	0,0249
Cu - 190 °C	0,2105	0,1628	0,3894	5,52	0,1421	0,0361
Cu - 200 °C	0,1025	0,0919	0,1896	5,53	0,0806	0,0205
Cu - 210 °C	0,1312	0,1218	0,2427	5,21	0,0964	0,0245

CMC nanesená na textilním nosiči v průměru absorbovala 59,3 % mědi. Dávka soli síranu měďnatého pentahydrátu v průměru obsahovala 1,08 g mědi. Ukázka absorpce iontů mědi z roztoku je zobrazena na Obr. 100.



Obr. 100: Ukázka reakce CMC netkané textilie a roztoku pentahydrátu síranu měďnatého

Tab. 28: Průběh experimentu sorpce iontů kovů pomocí CMC síťované při různých teplotách

Ionty kovů - teplota síťování CMC	Váha CMC [g] před	Váha CMC [g] po	Dávka soli [g]	pH roztoku	Zbylé množství soli v roztoku po reakci [g]	Zbylé množství kovu v roztoku po reakci [g]
Sn - 160 °C	0,1518	0,1503	0,2539	2,72	0,0616	0,0324
Sn - 170 °C	0,1341	0,1304	0,2243	2,78	0,0575	0,0302
Sn - 180 °C	0,1508	0,1412	0,2522	2,71	0,0720	0,0378
Sn - 190 °C	0,1121	0,1018	0,1875	2,87	0,0599	0,0315
Sn - 200 °C	0,1031	0,0927	0,1724	2,89	0,0573	0,0301
Sn - 210 °C	0,1902	0,1625	0,3181	2,83	0,0606	0,0318

CMC nanesená na textilním nosiči v průměru absorbovala 73,8 % cínu. Dávka soli chloridu cínatého dihydrátu v průměru obsahovala 0,45 g cínu.

Jak můžete vidět dle výsledků uvedených v Tab. 26, Tab. 27 a Tab. 28, vzorky s obsahem CMC opravdu fungují jako odstraňovače iontů kovů.

Bylo zjištěno, že povrstvené textilie pomocí CMC prokázaly výraznou účinnost při odstraňování těžkých kovů. Vysoké teploty použité při polymerizaci a síťování nemají výrazný vliv na absorpci iontů kovů.

5 Diskuze a závěr

Cílem disertační práce bylo vytvořit CMC hydrogel v různých formách, některé pro růst buněk jiné naopak pro antimikrobiální krytí.

CMC je velmi rychle rozpustná jak ve studené, tak i teplé vodě. Z toho důvodu bylo v průběhu výzkumu nutné najít optimální způsob síťování CMC. V rámci práce byly navrženy a zavedeny metody pro síťování CMC a testování CMC hydrogelů. Za nejlepší metodu síťování CMC považují síťování fyzikálními metodami (mrazíciemi cykly, vysokou teplotou). Kritériem výběru byl co možná nejvyšší poměr absorpce/rozpustnost, což odpovídá zamýšlené aplikaci jako krytí ran. Další zajímavá metoda síťování se dle výsledků jeví síťování s využitím vakuového plazmatu, kdy hydrofobní chování povrchu upraveného vzorku je pravděpodobně způsobeno změnou morfologie struktury povrchu. Testování absorpce bylo provedeno i v různých tlumivých roztocích podobných krevní plazmě.

Připravené hydrogely byly testovány pro jejich vhodnost pro růst buněk a jako nosiče nanočástic. Nanočástice byly redukovány z dusičnanu stříbrného, a to zvýšenou teplotou, UV zářením či kyselinou askorbovou. Dle předpokladu vzorky ve svém objemu obsahují stříbrné ionty i nanočástice kovového stříbra. Přičemž byla prokázána i antibakteriální aktivita kyselé formy CMC (i bez nanočástic) nebo neutrální formy, která byla okyselena kyselinou askorbovou. Výsledky uvolňování stříbra ze vzorků textilií do fyziologického roztoku poskytly informaci o tom, že množství uvolněného stříbra ze vzorku netkané textilie kyselého typu CMC (s koncentrací použitého dusičnanu stříbrného $0,1 - 2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) je obdobné množství uvolněného stříbra z komerčně prodávaných vzorků antibakteriálních krytí s obsahem stříbra. Z důvodu podpory rány se lépe hojit byl do CMC rovněž přidán alaptid. Byla provedena celá řada biologických experimentů na stanovení toxicity připravených vzorků či na vhodnost vzorků k proliferaci buněk.

Díky schopnosti CMC absorbovat extrémní množství vody byla navržena metoda tvorby mikroporézní struktury pomocí lyofilizace (mrazová sublimace), kdy se voda odpařuje ze zmražených vzorků. V principu se jedná o sublimaci krystalků ze zmrzlého produktu za sníženého tlaku. Tlak musí být natolik nízký, aby při zvyšování teploty ve vzorku nedocházelo k tání, ale k přechodu z pevné fáze přímo do plynné. Vzniklé páry prochází sušenou částí produktu na povrch a dále pokračují komorou přístroje do kondenzátoru. Právě při tomto průchodu par skrz vzorek

dochází k otevírání struktury vzorku a tvorbě mikroporézní „pěnové“ struktury. Tato vysoce porézní struktura odpovídá všem požadavkům na materiály vhodných pro proliferaci buněk.

Celkově lze shrnout, že CMC je velmi perspektivní materiál, který je netoxický a biodegradabilní. Právě pro tyto vlastnosti je předurčen pro použití ve zdravotnických aplikacích.

Z časových důvodů nebylo možné v práci obsáhnout více možných aditiv, které by podpořily hojení tkání a růst buněk. S ohledem na tuto skutečnost bych v budoucnu doporučila vyzkoušet více aditivních látek namísto nanočástic.

6 Publikace autora

Databáze Scopus – 14 příspěvků

Databáze Web of Science – 10 příspěvků (IP 3x)

h-index – 4 (dle databáze Scopus)

h-index – 2 (dle databáze Web of Science)

Práce autora k studované problematice:

Časopisy:

1. Boruvkova, K., Wiener, J.: Water absorption in carboxymethyl cellulose. *Autex Research Journal*, 11/2011, vol. 11, No. 4, pp. 110-113, ISSN 1470-9589 – IP 0,405
2. Boruvkova, K., Wiener, J., Kukreja S.: Thermal self cross-linking of carboxymethyl cellulose. *ACC Journal*, XVIII, 1/2012, Issue A, pp. 30-40, ISSN 1803-9782
3. Boruvkova, K., Wiener, J.: Properties of modified carboxymethyl cellulose prepared by lyophilization. *13th Autex World Textile Conference*, 05/2013 - *Autex research journal*, No. 3/2013, ISSN 1470-9589 – IP 0,618

Konference:

4. Boruvkova, K., Wiener, J., Mullerova, J.: Testing of carboxymethyl cellulose in fiber form. *13th International Conference Strutex*, 11/2011, Liberec, Czech republic, ISBN 978-80-7372-786-4
5. Boruvkova, K., Wiener, J., Ramadan, A., Saskova, J.: Surface modification of polyester fabric by silver nanoparticles in cellulose matrix. *Nanosmat*, Praha, 9/2012
6. Boruvkova, K., Wiener, J., Jakubickova, M.: Preparation and properties of microporous structures based on CMC. *Nanocon*, Brno, 10/2012, ISSN 978-80-87294-32-1
Boruvkova, K., Wiener, J.: Preparation of microporous structures based on CMC. *19th International Conference Strutex*, 11/2012, Liberec, Czech republic, ISBN 978-80-7372-913-4
7. Boruvkova, K., Wiener, J.: Preparation and properties of microporous structures based on carboxymethyl cellulose modified by silver nanoparticles. *XXIII IFATCC International Congress*, 05/2013, ISBN 9789639970335
8. Boruvkova, K., Wiener, J., Nemeckova, J., Safarova, V.: Synthesis of gold nanoparticles in the polymer matrix. *Nanocon*, 2013, ISBN 978-80-87294-44-4
9. Boruvkova, K., Wiener, J., Ramadan, A., Šašková, J.: Modification of nonwoven fabric by silver nanoparticles in a cellulose matrix, *Fiber Society Spring 2014 Conference*, Liberec, pp. 159-160, 5/2014

10. Boruvkova, K., Wiener, J., Kolinova, M.: Changes in selected properties of carboxymethyl cellulose materials after lyophilization. *Nanocon*, 2014, ISBN 978-80-87294-55-0
11. Boruvkova, K., Wiener, J.: Ion removal from waste water, *PAPN*, 2013, ISBN 978-80-7372-988-2
12. Boruvkova, K., Wiener, J., Kaminska, M., Kolinova, M.: Suitability of lyophilized polymers based on CMC for cell proliferation, *Nanocon*, 2015, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, Conference Proceedings, pp. 565-570

Ostatní:

13. Boruvkova, K., Wiener, J.: Preparation of microporous structures based on CMC by freeze drying. *Zpravodaj Spolku textilních chemiků a koloristů*, 4/2012, p. 27-31, ISSN 1214-8091
14. Boruvkova, K. Preparation of microporous structures containing silver nanoparticles. *Světlanka*, 2013 - *Workshop pro doktorandy FT a FS TUL*, ISBN 978-80-7372-987-5
15. Boruvkova, K.: Crosslinking of carboxymethyl cellulose by plasma treatment, *Světlanka*, 2014 - *Workshop pro doktorandy FT a FS TUL*, ISBN 978-80-7494-100-9
16. Boruvkova, K., Wiener, J.: Polymer films based on cellulose containing silver nanoparticles and vitamin C – ACC journal 1/2015

Práce autora mimo studovanou problematiku:

17. Messiry, E. M., Al-Oufy, Fadel, N., Wiener, J., Boruvkova, K.: Investigation of plasma-NaOH/Thiourea/urea treatment on Moisture Management Properties of Knitted Polyester/ Lycra Sportswear Fabric 3rd CNCTI, 03/2015
18. Voleský, L., Borůvková, K., Bakalová, T., Kovačič, V., Louda, P.: Impregnating emulsion containing nanoparticles (TiO₂, SiO₂ and ZrO₂) reducing wear and improving the hydrophobic properties of various surfaces, *Nanocon*, 2015, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, Conference Proceedings, pp. 366-372
19. Bakalova, T., Svobodová, L., Rosická, P., Voleský, L., Borůvková, K.: Impact of natural nanoadditives SiO₂ and TiO₂ on the quality of machining process fluids and bactericidal properties, *Nanocon*, 2015, 7th International Conference on Nanomaterials – Research and Application, Conference Proceedings, pp. 331-336
20. Bakalova, T., Louda, P., Voleský, L., Borůvková, K., Svobodová, L.: Nanoadditives SiO₂ and TiO₂ in process fluids, *Manufacturing Technology*, 15(4), pp. 502-508, 2015
21. Boruvkova, K., Bakalova, T., Volesky, L., Louda, P.: The influence of nanoadditives on the biological properties and chemical composition of process fluids - *Journal of Physics: Conference Series*, 709(1),012001, 2016

22. Voleský, L., Bakalova, T., Borůvková, K., Louda, P.: The impact of the deposition parameters on the mechanical properties of thin carbon layers – *Defect and Diffusion Forum* 368, pp. 95-98, 2016
23. Bakalova, T., Svobodová, L., Rosická, P., Voleský, L., Louda, P., Borůvková, K.: The application potential of SiO₂, TiO₂ or AG nanoparticles as fillers in machining process fluids, *Journal of Cleaner Production*, 142, pp. 2237-2243, 2017
24. Kaczmarek, L., Kula, P., Warg, T., Pawlovski, W., Zawadzki, P., Borůvková, K.: Creation of a 3D structures based on the high strength metallurgical graphene, *Surface Review and Letters*, 2018 – IP 0,734

7 Literární zdroje

- [1] <http://aplchem.upol.cz> [cit. 11.12.2014]
- [2] Roohani, M., Habibi, Y., Belgace, N. M., Ebrahim, G., Karimi, A. N., Dufresne, A.: *European polymer journal*. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.05.024
- [3] Hladík, V., a kolektiv: *Textilní vlákna*. SNTL, Praha, 1971
- [4] Blažej, A., Šutá, Š.: *Vlastnosti textilních vláken*. Alfa, Bratislava, 1981
- [5] Slávik, I.: *Celulóza a jej chemické spracovanie*, Slovenská Akadémia Vied, 1953
- [6] <http://www.techportal.cz/1/1/celuloza-cid33965/> [cit. 16.12.2014]
- [7] http://www.ft.tul.cz/depart/ktm/files/chemicka_vlakna.pdf [cit. 05.12.2013]
- [8] <http://www.synthesia.eu/cz/Obchod/Obchodni-jednotky/SBUNitroceluloza/Oxyceluloza> [cit. 10.03.2015]
- [9] Zhao, H., Cheng, F., Li, G.F., Zhang, J.W.: Optimization of a process of carboxymethyl cellulose (CMC) preparation in mixed solvents. *International Journal of Polymeric Materials* 52, pp. 749-759, 2003
- [10] Bodvik, R., Dedinaite, A., Karlson, L., Bergström, M., Bäverbäck, P., Pedersen, J., Edwards, L., Karlsson, G., Varga, I., Claesson, P.: *Aggregation and Network Formation of Aqueous Methylcellulose and Hydroxypropylmethylcellulose Solutions*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* (2008), doi:10.1016/j.colsurfa.2009.09.040
- [11] Paljevac, M., Primožič, Habulin, M., Novak, Z., Knez Ž.: *Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures*. *Journal of Supercritical Fluids* 43, 2007
- [12] Hollabaugh, C., Leland, H., et al.: *Carboxymethylcellulose*, Hercules Powder company, 943, October 1943
- [13] Huarong, N., Mingzhu, L., et al.: *Carbohydrate Polymers*, Sciencedirect, Vol.58, 2004, pp. 185-189
- [14] He, X.J., Wu, S.Z., Fu, D.K., Ni, J.R.: *Preparation of sodium carboxymethylcellulose from paper sludge*. *J.Chem.Technol.Biotechnol.*84, p. 427-434, 2009
- [15] Deutsche Celluloid Fabrik (Jansen). DE Patent 332,203, Jan 22, 1921
- [16] Chowdhury, J.K.: *Biochem. Z.* 148, pp. 76-97, 1924
- [17] Höppler, F.: *Chem.-Ztg.*, 66, pp. 132-135, 1942
- [18] Adel, A. M., Abou-Youssef, H., El-Gendy, A. A., Nada, A. M.: *Carboxymethylated Cellulose Hydrogel*. Sorption Behavior and Characterization, *Nature and science* 8, 2010
- [19] Biswal, D. R., Singh, R. P.: *Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer*. *Carbohydrate Polymers* 57, 2004
- [20] Sahin, U.: *An easy and accurate method for determining degree of substitution on carboxymethylated cotton fabric*, *Tekstil ve Konfeksiyon* 28(2), 2018
- [21] Sara, R., Lo, G.: *Characterisation of the substituent in starch and cellulose derivatives*. *Analytica Chimica Acta* 497, pp. 27-65, 2003
- [22] Silva, D.A., De Paula, R.C.M., Feitosa, J.P.A., De Brito, A.C.F., Maciel, J.S., Paula, H.C.B.: *Carboxymethylation of cashew tree exudate polysaccharide*. *Carbohydrate Polymers* 58, pp. 163-171, 2004
- [23] Ginkel, C.G., Gayton, S.: *The biodegradability and nontoxicity of carboxymethyl cellulose (DS 0,7) and intermediates*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 15, No. 3, p. 270-274, 1996
- [24] Du Pont (Ellsworth). US Patent 2,060,056, Nov 10, 1936
- [25] Lrltenield, L. US Patent 1,682,293, Aug 28, 1928
- [26] Butun, S., Gulince, F., Erdugan, H., Sahiner, N.: *One-step fabrication of biocompatible carboxymethyl cellulose polymeric particles for drug delivery systems*. *Carbohydrate Polymers* 86, 2011
- [27] Allan, J.; Wainwright, J. A. US Patent 2248048, July 08, 1941
- [28] <http://spisy.upv.cz/Patents/FullDocuments/211/211876.pdf> [cit. 26.02.2015]
- [29] Mleziva, J., Kákal, J.: *Základy makromolekulární chemie*. SNTL, Praha 1986
- [30] Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H.: *Hydrogels in pharmaceutical*

- formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 50, 2000
- [31] Adel, A. M., Abou-Youssef, H., El-Gendy, A. A., Nada, A. M.: *Carboxymethylated Cellulose Hydrogel; Sorption Behavior and Characterization*. Nature ans Science 8(8), 2010
 - [32] Saiki, S., Nagasawa, N., Hiroki, A., Morishita, N., Tamada, M., et al.: *ESR study on radiation-induced radicals in carboxymethyl cellulose aqueous solution*. Radiation Physics and Chemistry, volume 80 (Issue 2), pp.149–152, 2011
 - [33] http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20100519&DB=&locale=en_EP&CC=EP&NR=1836227B1&KC=B1&ND=1
[cit. 10.01.2014]
 - [34] Wach, R. A., Mitomo, H., Nagasawa, N., Yoshii, F.: *Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solutions of natural pH*. Radiation Physics and Chemistr, 68, 2003
 - [35] Favia, P., d'Agostino, R.: *Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications*. Surface and Coatings Technology 98, pp. 1102 - 1106, 1998
 - [36] Chang, Ch., Duan, B., Cai J., Zhang, L.: *Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 46, 2009
 - [37] Gupta, S., Goswami, S., Sinha, A.: *Acombined effect of freeze-thaw cycles and polymer concentration on the structure and mechanical properties of transparent PVA gels*, Biomedical Materials 7(1):015006 · January 2012
 - [38] Guan, Y., et al.: *Physically croslinked composite hydrogels of Hemicelluloses with Poly(vinylAlcohol phosphate) and Chitin nanowhiskers*, Bioresources 10(1), 2015, pp. 1378-1393
 - [39] Benchabade, A.: *Rheological Properties of carboxymethyl solutions*, Colloid and Polymer Science, Chemistry and Material Science Institute, Vol.286, Issue No. 10.2008, pp. 1173-1180.
 - [40] Hashem, M., Sharaf, S., Abd El-Hady, M. M, Hebeish, A.: *Synthesis and chracterization of novel carboxymethylsellulose hydrogels and carboxymethylcellullose-hydrogel-ZnO-nanocomposites*. Carbohydrate polymers 95, 2013
 - [41] Sannino A., Demitri, Ch., Madaghiele M.: *Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Appliations*. Materials, 2009
 - [42] Kreibig, U, Boennemann, H., et al.: *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*, Vol. 3 (H. S. Nalwa, ed.), Academic Press, San Diego, pp. 1-87, 2001
 - [43] Romanska, D., Mazur, M.: *Electrochemical preparation of thiol-coated silver nanostructures on highly oriented pyrolytic graphite*. Langmuir 19, pp. 4532-4534, 2003
 - [44] Creighton, J. A., Blatchford, C. G. et al.: *Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pryidine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength*. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 75, pp. 790-798, 1975
 - [45] Lee, P. C., Meisel, D.: *Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols*. Journal of Physical Chemistry 86, pp. 3391-3395,1982
 - [46] Bell, W. C., Myrick, M. L., et al.: *Preparation and characterization of nanoscale silver colloids by two novel synthetic routes*. Journal of Colloid and Interface Science 242, pp. 300-305, 2001
 - [47] Esumi, K., Ishizuki, N., Torigoe, K., Nakamura, H., Meguro, M.: *Preparation of colloidal silver using various reductants in the presence of copolymers of vinyl alcohol-N-vinyl pyrrolidone*. Journal of Applied Polymer Science 44, pp. 1003-1007, 1992
 - [48] Li, Y. S., Cheng, J. C., Coons, L. B.: *A silver solution for surface-enhanced Raman scattering*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy 55, pp. 1197-1207, 1999
 - [49] Soni, I., Goia, D. V., Matijevic, E.: *Preparation of highly concentrated stable dispersions of monodispersed silver nanoparticles*. Journal of Colloid and Interface Science 260, pp. 75-81, 2003
 - [50] Callegari, A., Tonti, D., Chergui, M.: *Photochemically grown silver nanoparticles with wavelength-controlled size and shape*. Nano Letters 3, pp. 1565-1568, 2003
 - [51] Gutierrez, M., Henglein, A.: *Formation of colloidal silver by “push-pull” reduction of*

- Ag⁺. Journal of Physical Chemistry 97, pp. 11368-11370, 1993
- [52] Panacek, A., Kvitek, L., Prucek, P., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V. K., Nevecna, T., Zboril, R.: *Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity*. Journal of Physical Chemistry B 110, pp. 16248-16253, 2006
- [53] Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J., Shah, S. I.: *Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology 5, pp. 244-249, 2005
- [54] Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramirez, J. T., Yacaman, M.: *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology 16, pp. 2346-2353, 2005
- [55] Matthews, K.H., Stevens, H.N.E., Auffret, A.D., Humphrey, M.J., Eccleston, G.M.: *Lyophilized wafers as a drug delivery system for wound healing containing methylcellulose as a viscosity modifier*. International Journal of Pharmaceutics 289, pp. 51-62, 2005
- [56] Blomfeldt, T.O.J., Olsson, R.T., Menon, M., Plackett, D., Johansson, E., Hedenqvist, M.S.: *Novel foams based on freeze-dried renewable vital wheat gluten*. Macromol. Materials and Engineering 295, pp. 796-801, 2010
- [57] Jampílek, J., Opatřilová, R., Řezáčová, A., et al. inventors: *Alaptide: methods of effecting its solubility, membrane penetration and pharmaceutical composition for human and veterinary applications*. University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno, PV 2011-232
- [58] Pokorná, M.: *Sorpční schopnosti huminových kyselin*. DP 2011. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=36681 [cit. 25.02.2018]
- [59] <https://www.knowyourbody.net/stratum-basale.html> [cit. 20.02.2019]
- [60] Martinuik, H., Więckowska, J.: *Adsorption of metal ions on humic acids extracted from brown coals*. Fuel Processing Technology. 2003, no. 84, s. 23-36. ISSN 0378-3820.
- [61] Lanouette, K. H.: *Industrial Waste Water and interaction Solid Waste Engineering*, V. Cavaseno et al., Eds., McGraw-Hill, New York, 1980, pp. 116
- [62] Pamphlet produced by the Lexington Water and Sewer Division, 201 Bedford Street, Lexington, MA 02173
- [63] Barrell, D.C.: *Atomic Spectrophotometer Analysis of Heavy Metals Pollutants in Water*, Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, MI (1975) p. 25.
- [64] Pendias, A., Pendias, H.: *Trace Metals in Soil and Plants*, CRC press, Boca Raton, FL (1992) pp. 75-86.
- [65] Banum, S.J.: *Introduction to Organic and Biological Chemistry* (third ed.), Macmillan Publishing Co., New York, NY (1982) p. 541.
- [66] Soffiotti, U., Wagoner, J.K.: *Occupational Carcinogenesis*, New York Academy of Science (1976) pp. 271.
- [67] Wiley, J.: *Polymer Grafting and Crosslinking*. Public Health of Belgrade, Bul.Despota Stefana 54a and Paramita Ray Copyright.2009.
- [68] Jaber, F.: *New routes for synthesis of environmentally friendly superabsorbent polymers*. Thesis, An-Najah National University, Palestine, 2012
- [69] Mihaljevič, M., Strnad, L., Šebek, O.: Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. Chemické listy 98, pp. 123-130, 2004
- [70] Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie. „http://nanosystemy.upol.cz/download/2009/12-ws/safarova_sem.pdf“ [online]. [cit.12.02.2019]
- [71] Mikroskopie atomárních sil. „http://nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php“ [online]. [cit.12.02.2019]
- [72] Transmisní elektronová mikroskopie. „<http://atmilab.upol.cz/texty/TEM-teorie.pdf>“ [online]. [cit.12.02.2019]
- [73] Yin, J., Yang, G., Wang, H., Chen, Y.: *Macroporous Polymer Monoliths Fabricated by Using Metal - Organic Coordination Gel Template*. The Royal Society of Chemistry, 2007
- [74] Fišar, Z.: *Fluorescenční spektroskopie v neurověděch*. Psychiatrická klinika. 1. lékařská

- fakulta UK [online]. Dostupné z:
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfisar/fluorescence/soubory/fluorescence.pdf> [cit. 03.12.2017]
- [75] Veselá, M.: *Fluorescenční mikroskopie*. Chempoint [online].
Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/fluorescencni-mikroskopie> [cit. 14.12.2017]
- [76] Černý, J.: *Fluorescenční mikroskopie*. Oddělení vývojové biologie, Katedra fyziologie živočichů. Přírodovědecká fakulta UK v Praze [online]. Dostupné z:
<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/3cerny.pdf> [cit. 15.02.2017]
- [77] Brychrová, S., Bezděková, M., Brychta T.: *Fibroblasty – buňky známé či neznámé?* Laboratoř molekulární patologie a Ústav patologie. Lékařská Fakulta UP, Olomouc [online]. Dostupné z: <http://www.cspatologie.cz/docs/51-abstraktCZ.pdf> [cit. 26.10.2017]
- [78] Levina, M.E., Kharitinova, A.M., Rovensky, A.Y., Vasiliev, M.J.: *Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate*, Journal of Cell Science 114, pp. 4335-4341, 2001
- [79] Leonardis, M., Palange, A., Dornelles R., Hund, F.: *Use of cross-linked carboxymethyl cellulose for soft-tissue augmentation: preliminary clinical studies*. Clinical Interventions, pp. 317-322, 2010
- [80] XTT Instruction manual. „<http://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>“ [online]. [cit. 12.12.2014]

Seznam obrázků

Obr. 1: Ukázka glykosidické vazby [1]	20
Obr. 2: Vzorec celulózy [4]	22
Obr. 3: Sorpční a desorpční izoterma celulózy při 25 °C [4]	23
Obr. 4: Vzorec CMC [10]	30
Obr. 5: Tvorba hydrogelové sítě díky intermolekulárním vodíkovým vazbám V CMC s nízkým pH.....	37
Obr. 6: Ochlazování horkého roztoku karagenanu	39
Obr. 7: Struktura s-alaptidu (zdroj: http://tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=A-174001&name=ALAPTIDE).....	46
Obr. 8: Schéma lidské kůže [58].....	48
Obr. 9: Ukázka použité práškové sodné soli CMC.....	50
Obr. 10: Ukázka použité vláknenné formy CMC	50
Obr. 11: Ukázka počítání buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu.....	66
Obr. 12: Povrchová struktura plazmovaného vzorku (a) vlevo a (b) vpravo	74
Obr. 13: Povrchová struktura neplazmovaného vzorku (a) vlevo a (b) vpravo.....	74
Obr. 14: Měření kontaktního úhlu za použití barviva.....	75
Obr. 15: Struktura CMC filmu před lyofilizací	82
Obr. 16: Struktura CMC filmu po lyofilizaci	82
Obr. 17: Struktura CMC filmu tvořeného rozpuštěním netkané textilie před lyofilizací.....	83
Obr. 18: Struktura CMC filmu tvořeného rozpuštěním netkané textilie po lyofilizaci ..	83
Obr. 19: Struktura CMC netkané textilie před lyofilizací	83
Obr. 20: Struktura CMC netkané textilie po lyofilizaci.....	83
Obr. 21: Fotografie testovaných vzorků: CMC film (vlevo), CMC film z netkané textilie (uprostřed) a CMC netkaná textilie (vpravo).....	83
Obr. 22: Snímky z CT testovaných vzorků: CMC film (vlevo), CMC film z netkané textilie (uprostřed) a CMC netkaná textilie (vpravo).....	84
Obr. 23: Kontrolní vzorek – živé buňky	86
Obr. 24: Kontrolní vzorek – mrtvé buňky	86
Obr. 25: Lyofilizát netk. textilie – živé buňky.....	87
Obr. 26: Lyofilizát netk. textilie – mrtvé buňky	87
Obr. 27: Lyofilizát – živé buňky, jamka pod vzorkem	87
Obr. 28: Ukázka reakce XTT	88
Obr. 29: Snímky z opti. mikroskopie buněk po 24hodinové inkubaci v médiu 0,1 % Tritonem X-100 s extrakty materiálů CMCNa, NaT a HT o koncentracích 10 mg/ml a 5 mg/ml.....	92
Obr. 30: Snímky z optické mikroskopie buněk po 48hodinové kultivaci na dně kultivační jamky (TCP), s obsahem materiálu CMCNa, na rozhraní s materiálem NaT a HT	94
Obr. 31: SEM (BSE) vzorku PES wet laid, který je upraven, sušen a fixován při 180 °C po dobu 15 minut	96
Obr. 32: SEM (BSE) vzorku PES wet laid, který je upraven, sušen a fixován při 200 °C po dobu 15 minut	96
Obr. 33: SEM (BSE) vzorku PES vatelín, který je upraven, sušen a fixován při 180 °C po dobu 15 minut	96
Obr. 34: SEM (BSE) vzorku PES vatelín, který je upraven, sušen a fixován při 200 °C po dobu 15 minut	96

Obr. 35: Vzorek CMC filmu, který byl upraven, sušen a fixován při 200 °C po dobu 15 minut.....	98
Obr. 36: vzorek 1 - Vitalux	99
Obr. 37: vzorek 1- denní světlo	99
Obr. 38: vzorek 2 - Vitalux	99
Obr. 39: vzorek 2 - denní světlo.....	99
Obr. 40: Vzorek č. 2 - rozp. textilie	105
Obr. 41: Snímek ze SEM - vzorek č. 1.....	107
Obr. 42: Snímek ze SEM - vzorek č. 2.....	107
Obr. 43: Snímek ze SEM - vzorek č. 3.....	107
Obr. 44: Snímek ze SEM - vzorek č. 4.....	107
Obr. 45: Snímek ze SEM - vzorek č. 5.....	107
Obr. 46: Snímek ze SEM - vzorek č. 6.....	107
Obr. 47: Vzorek č. 3 – nanočástice stříbra	108
Obr. 48: CMC netkaná textilie s nanočásticemi stříbra	109
Obr. 49: CMC netkaná textilie po lyofilizaci.....	110
Obr. 50: Oplazmovaný CMC film.....	110
Obr. 51: CMC roztok zesíťovaný pomocí BDDGE s následným sušením	111
Obr. 52: Vzorek č. 1	111
Obr. 53: Vzorek č. 2.....	111
Obr. 54: Vzorek č. 3	112
Obr. 55: Vzorek č. 4.....	112
Obr. 56: Vzorek č. 1 - 1300x.....	112
Obr. 57: Vzorek č. 1 - 5000x.....	112
Obr. 58: Vzorek č. 2 - 1300x.....	113
Obr. 59: Vzorek č. 2 - 5000x.....	113
Obr. 60: Vzorek č. 3 - 1300x.....	113
Obr. 61: Vzorek č. 3 - 5000x.....	113
Obr. 62: Vzorek č. 4 - 1300x.....	113
Obr. 63: Vzorek č. 4 - 5000x.....	113
Obr. 64: Kontrolní vzorky	114
Obr. 65: Povrch kontrolního vzorku	114
Obr. 66: Roztok s bakteriemi E. coli.....	115
Obr. 67: Růstová média pro bakterie	115
Obr. 68: Příklad fluorescenčního značení mrtvých a živých buněk, zvětšení 500x.....	115
Obr. 69: (bis-benzimidide) pentahydrate + Propidium Iodide	116
Obr. 70: Live/dead BacLight™ Bacterial Viability Kit.....	116
Obr. 71: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO ₃ 1 g·l ⁻¹	116
Obr. 72: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO ₃ 1 g·l ⁻¹	116
Obr. 73: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO ₃ 1 g·l ⁻¹	117
Obr. 74: Vzorek č. 1, koncentrace AgNO ₃ 0,1 g·l ⁻¹	117
Obr. 75: Vzorek č. 2	117
Obr. 76: Vzorek č. 2	117
Obr. 77: Vzorek č. 2	117
Obr. 78: Vzorek č. 2	117
Obr. 79: Vzorek č. 3	118
Obr. 80: Vzorek č. 3	118
Obr. 81: Vzorek č. 3, zvětšení 500 x.....	118
Obr. 82: Vzorek č. 4.....	119
Obr. 83: Vzorek č. 4.....	119

Obr. 84: Kontrolní vzorek – živé buňky	123
Obr. 85: Kontrolní vzorek – mrtvé buňky	123
Obr. 86: Vzorek č. 1 – živé buňky	123
Obr. 87: Vzorek č. 1 – mrtvé buňky	123
Obr. 88: Vzorek č. 1 – živé buňky, jamka pod vzorkem	123
Obr. 89: Vzorek č. 2 – živé buňky	124
Obr. 90: Vzorek č. 2 – mrtvé buňky	124
Obr. 91: Vzorek č. 2 – živé buňky, jamka pod vzorkem	124
Obr. 92: Vzorek č. 3 – živé buňky	125
Obr. 93: Vzorek č. 3 – mrtvé buňky	125
Obr. 94: Vzorek č. 3 – živé buňky, jamka pod vzorkem	125
Obr. 95: Vzorek č. 4 – živé buňky	126
Obr. 96: Vzorek č. 4 – mrtvé buňky	126
Obr. 97: Vzorek č. 4 – živé buňky, jamka pod vzorkem	126
Obr. 98: Kontrolní vzorek po reakci XTT kitu	127
Obr. 99: Vzorek č. 3 po reakci XTT kitu	127
Obr. 100: Ukázka reakce CMC netkané textilie a roztoku pentahydrátu síranu měďnatého	130

Seznam tabulek

Tab. 1: Komponenty pro růstové médium	65
Tab. 2: Vhodné extrakční poměry testovaných materiálů s různou tloušťkou dle ISO 10993-12.....	67
Tab. 3: Poměr absorpce/rozpustnost \pm směrodatná odchylka	73
Tab. 4: Výsledky vybraných síťovadel na stupeň zesílení dle normy ČSN EN ISO 10147	73
Tab. 5: Srovnání průměrných hodnot obou způsobů měření rozpustnosti.....	74
Tab. 6: Hodnocení stupně zesílení měřením kontaktního úhlu (kapička – 3 μ l vody) ...	75
Tab. 7: Navážky vzorků karboxymethylcelulózy a podíl rozpustný za zvolených podmínek	80
Tab. 8: Termoizolační vlastnosti (\pm směrodatná odchylka).....	84
Tab. 9: Prodyšnost.....	84
Tab. 10: Seznam měřených vzorků a naměřené koncentrace alaptidu v měřených ředěných vzorcích a koncentrace přepočtené na původní vzorky.....	89
Tab. 11: Použitý gradient mobilní fáze	90
Tab. 12: Výsledky metody AATCC 147 pro vzorek PES wet laid.....	98
Tab. 13: Výsledky metody AATCC 147 pro vzorek PES vatelín.....	98
Tab. 14: Obsah stříbra pomocí EDS.....	103
Tab. 15: Složení jednotlivých roztoků o objemu 50 ml	104
Tab. 16: Výsledky antibakteriální aktivity vzorků při použití agaru Tergitol 7 (hodnocena velikost inhibiční zóny)	105
Tab. 17: Výsledky antibakteriální aktivity vzorků při použití AATCC 147 (hodnocena velikost inhibiční zóny).....	105
Tab. 18: Výsledky antibakteriální aktivity vzorků při použití AATCC 100.....	106
Tab. 19: Výsledky antioxidační aktivity	106
Tab. 20: Výpočet množství bakterií	114
Tab. 21: Údaje komor (Ch)	120
Tab. 22: Specifická absorbance.....	126
Tab. 23: Změny vzhledu po 24 hodinách	128
Tab. 24: obsah kovu v 1 gramu sloučeniny.....	129
Tab. 25: Stanovení N kovu.....	129
Tab. 26: Průběh experimentu sorpce iontů kovů pomocí CMC síťované při různých teplotách	130
Tab. 27: Průběh experimentu sorpce iontů kovů pomocí CMC síťované při různých teplotách	130
Tab. 28: Průběh experimentu sorpce iontů kovů pomocí CMC síťované při různých teplotách	131

Seznam grafů

Graf 1: Absorpce CMC po síťování vybranými metodami	72
Graf 2: Rozpustnost CMC po síťování vybranými metodami.....	72
Graf 3: IČ spektrum CMC a celulózy	75
Graf 4: Souhrnné spektrum chemicky a radiačně upravených filmů.....	76
Graf 5: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,2 (hmotnostní přívažek - průběh experimentu v čase)	78
Graf 6: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,4 (hmotnostní přívažek - průběh experimentu v čase)	78
Graf 7: Absorpce vzorků CMC v roztoku A (hmotnostní přívažek - průběh experimentu v čase)	78
Graf 8: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,2 (hmotnostní přívažek) ...	79
Graf 9: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku s pH 7,4 (hmotnostní přívažek) ...	79
Graf 10: Absorpce vzorků CMC v tlumivém roztoku A (hmotnostní přívažek).....	79
Graf 11: Chromatogramy vzorků CMC zaznamenané ELSD detektorem. Komerční vzorek 90 000 (modře), komerční vzorek 250 000 (červeně), komerční vzorek 700 000 (zeleně), NaT (fialově) a HT (světle modře).	81
Graf 12: Absorpce testovaných vzorků	85
Graf 13: Rozpustnost testovaných vzorků	85
Graf 14: Výsledky XTT testu	88
Graf 15: Viabilita fibroblastů po inkubaci buněk s kontrolami a s testovanými extrakty materiálů (n=6)	91
Graf 16: Metabolická aktivita buněk měřená pomocí MTT testu na dně kultivační jamky a v jamkách s testovanými materiály (n≥6)	93
Graf 17: EDS spektrum vzorku PES vatelínu, sušeného a fixovaného při 200 °C po dobu 15 minut	96
Graf 18: EDS spektrum vzorku PES vet laid, sušeného a fixovaného při 200 °C po dobu 15 minut	97
Graf 19: Změna jasu PES vatelínu.....	97
Graf 20: Změna jasu vzorku PES wet laid.....	97
Graf 21: EDS spektrum vzorku 1 – Vitalux	100
Graf 22: EDS spektrum vzorku 1 – denní světlo	100
Graf 23: EDS spektrum vzorku 2 - Vitalux	100
Graf 24: EDS spektrum vzorku 2 - denní světlo.....	101
Graf 25: Kumulativní spotřeba kyslíku	102
Graf 26: Výsledky XTT testu	103
Graf 27: ICP – množství vylouhovaného stříbra ze vzorků.....	104
Graf 28: Okamžitá spotřeba kyslíku	120
Graf 29: Kumulativní spotřeba kyslíku	121
Graf 30: Kumulativní spotřeba kyslíku (vzorek č. 4)	122
Graf 31: Okamžitá spotřeba kyslíku (vzorek č. 4).....	122
Graf 32: Výsledky XTT	127

Curriculum vitae

Osobní údaje: **Ing. Karolína Voleská**

Datum narození: 28. 08. 1985

Národnost: ČR

Adresa: F.L.Čelakovského 4269/5, Jablonec nad Nisou 466 04

Telefon: +420 737 248 704

Email: karolina.voleska@tul.cz

Vzdělání:

2001 - 2005 Střední odborná škola a Vyšší odborná škola obalové techniky Štětí
- Obalová technika – Maturitní studijní program

2006 - 2009 Technická Univerzita v Liberci
- Technologie a design – Bakalářský studijní program,
Bakalářská práce na téma: Pevnost šitých spojů vojenských taktických vest

2009 - 2011 Technická Univerzita v Liberci
- Produktový management – Navazující Magisterský studijní program,
Diplomová práce na téma: Chemické modifikace celulózových vláken

2011 - dosud Technická Univerzita v Liberci
- Textilní technika a materiálové inženýrství – Doktorské studium,
Disertační práce na téma: Karboxymethylcelulóza

Absolvované zkoušky v rámci doktorského studia: Makromolekulární chemie

Experimentální technika v oboru

Matematická statistika a analýza dat

Specializace v oboru

Sorpční procesy

Praxe/výzkumná činnost:

- 2012 - 2013 „Modifikované materiály pro léčbu chronických a akutních ran a
Prevenici chirurgických infekcí ve zdravotnictví“ – TAČR, program
ALFA – Laboratorní technik
- 09/2012 – 2013 „Dětská univerzita“ – Lektor
- 01-10/2013 „Ekologicky přijatelné způsoby plstění“ – MPO TIP (FR-TI4/296)
– Laboratorní technik
- 2013 - 2014 „Vodní nanodisperze pro funkční povrchové úpravy“ – TAČR,
Program ALFA – Laboratorní technik
- 11/2013 - 2014 TONAK a.s. – Hlavní řešitel projektu (FR-TI4/296)
- 07/2014 - 2015 „Matricové systémy pro hojení kožních defektů pro humánní a
veterinární použití“ – TAČR, program ALFA (TA 04010065)
– Laboratorní technik
- 10/2014 - 2015 „Optimalizace užitečných vlastností procesních kapalin s využitím
nanostruktur“ – IA 05 (reg. č. – CZ.1.05/3.1.00.0306)
– Technik specialista
- 03/2015 - 2015 „Most vzdělávání, vědy a praxe“ – (reg. č. CZ.1.07/2.3.00/45.0030)
– Lektor
- 10/2017 – dosud „Pokročilé hybridní pásy pro výrobu kompozit přesným vinutím“
TAČR, program ZÉTA (TJ01000292) – Technický pracovník
- 01/2018 – dosud „Hybridní materiály pro hierarchické struktury“ - Operační program
Výzkum, vývoj a vzdělávání
(reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000843)
– Technický pracovník

SGS projekty:

- 2012 - Mikroporézní struktury na bázi celulóзовých derivátů (4871)
- 2013 - Vlastnosti polyfenolů sorbovaných do celulóзовých materiálů
- 2014 - Příprava mikroporézních struktur na bázi CMC pomocí lyofilizace
(21026)
- 2015 - Recyklace vláknenných materiálů na bázi PAN

Pracovní stáž:

- Holzbecher, spol. s r.o. barevna a bělidlo Zlích – 3 měsíce
- Lodz University of technology, Institute of Materials science and Engineering,
výzkumná stáž v biofyzikální divizi – 3 měsíce

Pedagogická činnost:

Asistence u cvičení předmětů: Barvení a tisk textilií
Textilní chemie
Údržba textilií

Vedení diplomových prací na téma:

Shezi, N.A.: *Carboxymethylcellulose in fiber form*, DP 2012

Jakubičková, M.: *Uvolňování prachových částic z bavlněné textilie po poškození*, DP 2013

Čermáková, P.: *Analýza vlastností vláken z králičí srsti*, DP 2014

Dohnalová, M.: *Struktury založené na síťované karboxymethylcelulóze*, DP 2015

Konference: TEXCHEM 2012

Nanosmat 2012

Nanocon 2012, 2013, 2014, 2015

XXIII IFATCC International Congress 2013

13th Autex World Textile Conference 2013

The Fiber Society Spring 2014 – Fibers for Progress

Certifikáty:

Trinity Entry Level Certificate in ESOL Skills for Life – anglický jazyk

Státní základní jazyková zkouška z anglického jazyka (B2)
